

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente

***Solea senegalensis* como bioindicador da qualidade
sedimentar estuarina**

Joana Cepeda da Silva Antunes

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente.

Orientador: Professora Doutora Maria Helena Ferrão Ribeiro da Costa

Lisboa

2011

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Helena Costa agradeço a sua inextinguível colaboração, por todo apoio e disponibilidade na orientação desta dissertação.

Ao Pedro Costa faço um especial agradecimento por todo o tempo dispensado, o incondicional apoio, tanto na aprendizagem de técnicas empregues na realização deste trabalho como conselhos úteis na elaboração do mesmo.

À Professora Doutora Sandra Caeiro pelo fornecimento de dados importantes para a execução deste trabalho.

Ao Instituto Nacional dos Recursos Biológicos (IPIMAR-INRB) pela colaboração neste trabalho, em particular a Miguel Caetano pelos dados gentilmente fornecidos, sem os quais este trabalho não ficaria completo.

À Sara Carreira pelo encorajamento nos momentos difíceis, pela cooperação durante todo o processo e pela sua amizade.

A todos os meus amigos pela preocupação, incentivo e apoio que sempre demonstraram.

Aos meus pais pela ajuda incondicional e a confiança que me transmitiram, desde sempre.

RESUMO

O objectivo deste estudo foi avaliar a qualidade sedimentar estuarina, utilizando como bioindicador a espécie *Solea senegalensis*. Em Setembro de 2010, recolheram-se vários indivíduos desta espécie em duas zonas de amostragem dos estuários do Sado e Mira. A qualidade sedimentar foi avaliada a partir da análise das respostas biológicas dos indivíduos amostrados e da análise da contaminação metálica dos sedimentos locais. Com este objectivo foram utilizados biomarcadores de exposição (níveis de metalotioninas) e biomarcadores histopatológicos (presença de lipidose, focos necróticos, hemorragias e inflamações) analisados no fígado dos indivíduos. As respostas biológicas obtidas nos indivíduos amostrados no estuário do Sado revelaram alterações histológicas, do órgão analisado, mais acentuadas do que as registadas no estuário do Mira. As concentrações de contaminantes metálicos presentes nos sedimentos estuarinos evidenciaram uma contaminação mais elevada no estuário do Sado, destacando-se os níveis de zinco, cobre e cádmio, provenientes provavelmente dos efluentes de origem antropogénica. No estuário do Mira constatou-se a presença de níveis moderadamente elevados de arsénio, provavelmente originários de rochas presentes nas margens do estuário. As características físicas (FF e TOM) dos sedimentos estuarinos amostrados demonstraram estar relacionadas com o nível da contaminação metálica e com a saúde dos peixes residentes. O estuário do Mira apresentou elevados teores de FF e TOM, que favorecem a coesão dos sedimentos e a retenção dos contaminantes, havendo menor disponibilidade de poluentes na coluna de água e por isso menos efeitos nefastos nas espécies estuarinas. Em contrapartida, os reduzidos teores de FF e TOM obtidos para o estuário do Sado poderão explicar os maiores efeitos adversos nos indivíduos. As características arenosas do sedimento relacionadas com baixo teor de FF e TOM, privilegia a biodisponibilidade dos poluentes na coluna de água e desta forma aumenta os efeitos adversos biológicos ocorridos.

ABSTRACT

This study's goal was to evaluate the quality of the estuarine sediments, using as bioindicator the species *Solea senegalensis*. In September 2010, some individuals were collected from two sampling areas, the Sado and Mira estuaries. The quality of the sediments was evaluated through the biological responses to some analyses made to those individuals and the analyses of the metallic contamination of the local sediments. There were measured biomarkers of exposure (methalothionine levels) and histological biomarkers (presence of lipids, necrotic foci, hemorrhage and inflammation) in liver. At Sado, individuals' biological responses show histological differences in this organ, in comparison to the Mira individuals. The concentrations of metallic contaminants present in the estuarine sediments show a higher level of contamination in the Sado estuary. There were found higher levels of zinc, copper and cadmium, probably from an anthropogenic influence. At Mira there was found a moderately high levels of arsenic, probably from the rocks present at the margins of this estuary. The physical characteristics (FF and TOM) of sampled sediments demonstrated to be related with metal contamination and with resident fishes health. The Mira estuary showed high levels of FF and TOM, which promote the cohesion of sediment particles and the retention of contaminants, with lower availability of pollutants in the water column and therefore less harmful effects on estuarine species occurred. In contrast, reduced levels of TOM and FF obtained in Sado Estuary may explain the major adverse effects observed in the individuals. The sandy sediment characteristics, related to low FF and TOM, favors the bioavailability of pollutants in the water column and thus increases the biological side effects.

ÍNDICE DE MATÉRIAS

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
ÍNDICE DE MATÉRIAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XII
SIMBOLOGIA E NOTAÇÕES.....	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ESTUÁRIOS	1
1.1.1 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DOS ESTUÁRIOS.....	1
1.1.2 GESTÃO DOS ESTUÁRIOS.....	2
1.2 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA E EFEITOS DE XENOBIÓTICOS EM ORGANISMOS ESTUARINOS	5
1.2.1 BIOINDICADORES	6
1.2.2 BIOMARCADORES	7
1.2.2.1 DEFINIÇÃO “BIOMARCADOR”	7
1.2.2.2 USO DE BIOMARCADORES EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS.....	8
1.2.2.3 TIPOS DE BIOMARCADORES	9
1.2.2.4 HISTOPATOLOGIA COMO BIOMARCADOR DE EFEITO	10
1.2.2.5 METALOTIONINAS COMO BIOMARCADOR DE EXPOSIÇÃO.....	11

1.2.3	CONTAMINAÇÃO METÁLICA DOS SEDIMENTOS ESTUARINOS	12
1.3.4	STRESS AMBIENTAL.....	17
1.3	RISCO PARA A SAÚDE HUMANA (FACTORES DE BIOACUMULAÇÃO (BAF'S))	18
2.	OBJECTIVOS.....	20
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1	MATERIAL	22
3.1.1	APARELHOS	22
3.1.2	REAGENTES	22
3.1.3	MATERIAL	23
3.2	RESUMO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE UTILIZADA.....	24
3.3	AMOSTRAGEM.....	25
3.3.1	CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS ECOSISTEMAS AMOSTRADOS	27
3.3.1.1	ESTUÁRIO DO SADO.....	27
3.3.1.2	ESTUÁRIO DO MIRA.....	30
3.4	SOLEA SENEGALENSIS	33
3.4.1	CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE	33
3.4.2	SOLEA SENEGALENSIS COMO BIOINDICADOR.....	34
3.4.3	FÍGADO.....	34
3.4.3.1	ARQUITECTURA DO PARÊNQUIMA HEPÁTICO.....	34
3.4.4	ANÁLISE BIOLÓGICA DOS ORGANISMOS.....	35

3.4.5	QUANTIFICAÇÃO DE MT NO FÍGADO DE SOLEA SENEGALENSIS	36
3.4.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO HEPÁTICO	37
3.5	ANÁLISE DOS SEDIMENTOS.....	39
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4.	RESULTADOS.....	42
4.1	DADOS MORFOMÉTRICOS.....	42
4.2	QUANTIFICAÇÃO DE METALOTIONINAS NO FÍGADO DE SOLEA SENEGALENSIS.....	42
4.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA	44
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4.5	ANÁLISE DOS SEDIMENTOS.....	51
4.5.1	CARACTERIZAÇÃO GERAL DO SEDIMENTO.....	51
4.5.2	CARACTERIZAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO METÁLICA	51
5.	DISCUSSÃO	56
6.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	66
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	ANEXO 1.....	1

INDICE DE FIGURAS

Figura 1- Metodologia aplicada na avaliação da qualidade sedimentar.	24
Figura 2 - Localização geográfica da zona de amostragem no estuário do Sado. Próximo da cidade de Setúbal e da zona industrial da península de Mitrena.Coordenadas GPS: 38°48'78" w : 08°84'64".....	26
Figura 3 - Localização geográfica da zona de amostragem de sedimentos na estação do estuário do Mira, inserido no viveiro da zona de Foros de Galeado. Coordenadas GPS N: 37°43' 84" W: 08°45' 22"... ..	26
Figura 4 - Representação fotográfica do linguado da espécie Solea senegalensis. .	33
Figura 5- Comparação dos níveis médios de concentração de MT (mg.g ⁻¹ peso seco) e respectivos desvio padrão, nas zonas de amostragem (Sado e Mira).	43
Figura 6- Observação de cortes histológicos do fígado de indivíduos S.senegalensis da amostragem do Mira	46
Figura 7 – Observação de cortes histológicos do fígado de indivíduos S.senegalensis da amostragem do Sado	47
Figura 8 - Apresentação e identificação de vários tipos de biomarcadores presenciados em indivíduos amostrados no estuário do Sado.	48
Figura 9 - Concentrações mínimas e máximas de contaminantes metálicos (µg.g ⁻¹ peso seco sedimento) nas estações de amostragem (Mira e Sado) e respectivos valores PEL e TEL dos metais zinco, cádmio, crómio, chumbo, cobre e, metalóide arsénio.	53
Figura 10 - Concentrações máximas e mínimas de metais na zona de amostragem do Sado e zona de referência do Mira.	54

NDICE DE TABELAS

Tabela 1- Classificação de materiais dragados de acordo com o grau de contaminação de metais (mg.kg ⁻¹) e compostos orgânicos (µg.kg ⁻¹).....	16
Tabela 2 - Níveis máximos de contaminantes metálicos admitidos em recursos piscícolas para consumo humano, segundo Regulamento Europeu 1881/2006.	16
Tabela 3 - Limites críticos de contaminação metálica em peixes e nos seus derivados (EC, 2001a; FDA, 1998).....	17
Tabela 4- Comprimento standard médio e desvio padrão associado dos linguados	42
Tabela 5 - Concentração de metalotioninas no fígado de Solea senegalensis (mg.g ⁻¹ peso seco)	43
Tabela 6 - Resumo de alterações histopatológicas analisadas no fígado da espécie S.senegalensis (adaptado de Costa et al., 2009c).	44
Tabela 7 - Observações histopatológicas e presença de biomarcadores em indivíduos S. senegalensis, das estações do Mira (SSM) e do Sado (SSS). A ocorrência de lesões é representada por (+) e a ausência por (-).	49
Tabela 8 - Valores de p do teste U de Mann-Whitney	50
Tabela 9 - Valores das correlações realizadas pelo teste de Spearman, entre as variáveis Cs e MT, no Sado, no Mira e no total das duas estações.	50
Tabela 10 - Valores percentuais de matéria orgânica total (TOM) e fracção fina (FF).	51
Tabela 11- Valores de SQG-Q relativos às duas estações de amostragem.....	54
Tabela 12 - Comprimento standard dos indivíduos S.senegalensis amostrados no estuário do Sado.....	2
Tabela 13 - Comprimento standard dos indivíduos S.senegalensis amostrados no estuário do Sado.....	2
Tabela 14 - Concentração de MT do fígado dos indivíduos S.senegalensis amostrados na estação do Sado.	3
Tabela 15 - Concentração de MT do fígado dos indivíduos S.senegalensis amostrados na estação do Mira.....	3
Tabela 16 - Concentrações de metais pesados presentes no estuário do Sado e valores de SQGQ associados (Caeiro,2005).....	4

SIMBOLOGIA E NOTAÇÕES

% - Percentagem

Ag – Prata

As – Arsénio

BAF's – Factores de bioacumulação

°C – Graus centígrados

Cd - Cádmio

Cr – Crómio

Cs – Comprimento Standard

Cu – Cobre

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

DPP – SMDE – Polarografia diferencial por impulsos – Eléctrodo de mercúrio de gota estática (*Diferencial pulse polarography – Staticdrop Mercury electrode*)

Eh – Potencial Redox

FAO – Organização de Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

FF – Fracção Fina

GPS – Sistema de posicionamento global (*Global Positioning System*)

HCB – Hexaclorobenzeno

HCl – Ácido Clorídrico

ha – Hectares

Hg – Mercúrio

HNO₃ – Ácido Nítrico

ICP- MS – Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy*)

INRB – Instituto Nacional Recursos Biológicos

IPIMAR – Instituto Pescas da Investigação e do Mar

km - Quilómetros

km² - Quilómetros quadrados

kDa – Unidade de massa atómica, quilo Dalton

M – Zona de amostragem do estuário do Mira

mg.kg⁻¹ – Miligramas por quilograma

MILLI-Q – Água ultrapura

m – Metros

m³.s⁻¹ – Metros cúbicos por segundos

mm - Milímetros

MT – Metalotioninas

Ni – Níquel

NRC – Conselho Nacional de Pesquisa (*The National Research Council*)

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

P_{af} – Peso amostra fresca

PAH – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

Pb – Chumbo

PCB – Bifenilos Policlorados

p_s – Peso seco do sedimento

psu – Unidade prática de salinidade

Pt – Peso húmido total

ROS – Espécies reactivas de oxigénio

S – Zona de amostragem do estuário do Sado

S.senegalensis - *Solea senegalensis*

SS – *Solea senegalensis*

SSS01 – Código de amostragem

SQG - Valores guia de qualidade sedimentar

TBT – Tributil

TOM – Matéria orgânica total

$\mu\text{g.kg}^{-1}$ – Microgramas por quilograma

WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

Zn – Zinco

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estuários

1.1.1 Importância ecológica dos estuários

Os estuários são considerados sistemas de grande importância ecológica, por serem biótopos essenciais aos processos ecológicos que suportam a vida e são, consequentemente, vitais para a manutenção do equilíbrio ecológico da biosfera. Segundo Cameron e Pritchard (1963), o estuário é um corpo de água costeiro semi-fechado que tem uma ligação livre com o mar, na qual se dilui, de forma mensurável, com a água doce proveniente da drenagem terrestre. Estes sistemas caracterizam-se, essencialmente, pela existência de baixas profundidades, pela recepção de nutrientes e de matéria orgânica transportados pelos rios ao longo das bacias hidrográficas, criando condições favoráveis ao desenvolvimento dos produtores primários e, consequentemente, ao suporte de cadeias tróficas.

Os estuários são fontes de alimentação e habitat para uma alargada gama de organismos bênticos, epi-bênticos e pelágicos, que têm um papel determinante nas cadeias tróficas marinhas. As espécies de maior porte, como as aves aquáticas migratórias e os mamíferos marinhos, também utilizam os estuários para repousar e beneficiar das excepcionais condições de abundância, para se alimentarem. A morfologia e a acção das marés a que estão sujeitos originam zonas de transição com características favoráveis às fases de reprodução e nidificação das aves.

Várias espécies de peixes residem nos estuários, de forma permanente ou temporária, encontrando aqui alimento e protecção contra possíveis presas, e/ou utilizando-os como viveiro (“nursery”) e nas etapas de desova.

Nas zonas temperadas, as margens lodosas a montante nos estuários, são ocupadas por habitats particularmente relevantes do ponto de vista ecológico: os sapais. O desenvolvimento de sapais depende da interacção de diversos factores, como a fisiografia da costa, a amplitude e a energia das marés, o tipo de sedimentos presentes e a tolerância das plantas em relação à salinidade e à imersão, sendo este último factor o mais condicionante. De facto, a vegetação dos sapais é caracterizada pela capacidade de suportar a imersão em água salgada e colonizar solos salgados, implicando a salinidade respostas osmóticas e nutricionais diferentes, para além de poder ter efeitos tóxicos directos. Desta forma, os sapais são locais de extrema produtividade biológica, que funcionam como berçário para várias espécies de peixes e crustáceos, actuando ainda como barreira natural, quer funcionando como filtro para a poluição proveniente das margens dos estuários, quer atenuando o impacto das cheias e a erosão costeira.

1.1.2 Gestão dos Estuários

Por constituírem zonas estratégicas, em termos sócio-económicos, os estuários têm sido alvo preferencial da actividade humana, que desde há muito se vem desenvolvendo nas margens dos principais estuários. A multiplicidade de interesses, desde a actividade portuária, industrial, agrícola, turismo e lazer, exploração de recursos naturais e conservação da natureza, gera frequentes conflitos de uso. A gestão dos estuários reveste-se, assim, de grande importância, tendo, como

objectivo principal, a preservação e protecção do ambiente estuarino e de todos os seres vivos inseridos nestes sistemas, incluindo o Homem.

Ao longo do litoral português, existem vários exemplos de fixação da população em estuários, como meio de sustento da vida humana: é o caso do estuário do Tejo, do Sado e do Douro. As várias potencialidades económicas nas zonas estuarinas, nomeadamente a fauna haliêutica existente, levaram a que se concentrassem grupos de pescadores no litoral português que exploram excessivamente estes recursos, por métodos artesanais ou industriais. Estes métodos influenciam indirectamente a qualidade dos estuários. O crescimento abusivo das pescas levou a que mais de metade dos recursos pesqueiros fosse explorada ao máximo, sem que as reservas de algumas espécies tivessem capacidade ou tempo de recuperar, havendo cada vez mais o perigo de se extinguirem. As espécies mais afectadas são as que vivem junto ao fundo, pois são as que têm maior valor comercial e por isso estão mais expostas às actividades pesqueiras. As diferentes artes de pesca representam, também, problemas acrescidos para as espécies estuarinas. A utilização de redes de deriva, ou a de arrasto de fundo, são técnicas pouco selectivas que capturam, indiscriminadamente, qualquer espécie, nomeadamente o linguado (*Solea senegalensis*) que acaba por ser pescado acidentalmente. Actualmente, cerca de 14 a 29% das pescas portuguesas resultam da captura por pesca artesanal.

Para além da pesca, existem outras actividades implementadas nas margens dos estuários que prejudicam a qualidade ambiental e reduzem grande parte do seu valor haliêutico. A existência de **actividades industriais** ligadas sobretudo à transformação de matérias-primas importadas, como as refinarias de petróleo,

centrais térmicas a fuel ou carvão, indústrias petroquímicas, refinarias de açúcar, moagem de cereais, e as indústrias siderúrgicas, de adubos e outras matérias-primas, exercem uma enorme pressão sobre os recursos pesqueiros.

A contaminação proveniente da actividade industrial pode ser caracterizada por elevada carga orgânica, metálica e de nutrientes. Esta contaminação é emitida para os rios ou directamente para os estuários, o que constitui uma ameaça para as comunidades que residem associadas ao sedimento e que têm valor comercial, já que a maioria dos contaminantes emitidos por estas actividades antropogénicas tende a ser adsorvido pela matéria particulada e a concentrar-se no ambiente sedimentar. A presença de contaminantes no ambiente sedimentar afecta a qualidade de vida das espécies residentes nestes sistemas, aumentando a potencial ocorrência de efeitos adversos nos organismos bentónicos, em particular nos suspensívoros ou detritívoros, devido aos processos de bioacumulação de contaminantes que ocorrem nestes organismos, como por exemplo os metais. (Lee *et al.* , 2000).

A **agricultura** é também uma fonte de poluição, embora difusa, cujos contaminantes mais perigosos são os pesticidas, os fertilizantes e outros tipos de químicos aplicados em solos circundantes aos estuários.

As **descargas de efluentes urbanos** são também contabilizadas como fonte de contaminação. Estas descargas podem ser provenientes da população residente nas margens dos estuários ou do turismo sazonal

Ao longo do tempo têm sido efectuadas dragagens, obras portuárias e aterros junto de estuários que aumentam a contaminação e os efeitos negativos sobre estes sistemas sensíveis, conduzindo à redução do número de indivíduos de várias espécies e em casos mais graves, resultando na sua extinção.

Em face dos considerandos referidos, a gestão dos recursos dos estuários deve pressupor um conjunto de acções que procure maximizar as potencialidades e os benefícios que proporcionam às populações deles dependentes, promovendo a harmonia dos diversos interesses comunicantes, e, acima de tudo, garantindo a preservação das espécies e as condições ambientais adequadas à protecção da saúde pública e dos ecossistemas.

1.2 Avaliação da presença e efeitos de xenobióticos em organismos estuarinos

A avaliação da presença de xenobióticos nos estuários é efectuada com base em testes de toxicidade aos organismos estuarinos, em condições laboratoriais e/ou de campo. Os testes em laboratório analisam os efeitos ocorridos num conjunto de indivíduos, dependendo do tempo de exposição e das concentrações de xenobióticos a que estão expostos (Jobling, 1995).

A avaliação do estado ecológico de um estuário e a informação necessária para conhecimento do estado dos organismos presentes no mesmo, fica incompleta quando considerada apenas a componente físico-química, que serve exclusivamente para identificar e quantificar a presença de tóxicos. A obtenção do significado biológico e tóxico dos poluentes que se querem analisar é conseguida através de biomarcadores e bioindicadores.

1.2.1 Bioindicadores

Os bioindicadores são organismos vivos sensíveis ou resistentes, cujas características se relacionam com determinados factores ambientais e, por esse motivo, são utilizados como agentes importantes na avaliação da qualidade ecológica de um determinado ecossistema, neste caso dos estuários. As alterações dos bioindicadores são factores fáceis de identificar, relativamente rápidos e pouco dispendiosos, e, por este motivo, existe uma grande quantidade de estudos efectuados recorrendo a estas ferramentas.

No entanto, para se realizar a avaliação do risco da contaminação de um local, é necessário ter um conhecimento aprofundado sobre a espécie em vigilância, as características ambientais e as reacções biológicas provocadas na presença de determinados poluentes, para, posteriormente, se poderem estabelecer relações causa-efeito. Existem vários factores que podem influenciar o comportamento dos bioindicadores. Estes factores podem ser naturais ou antropogénicos. Os factores naturais podem estar relacionados com o habitat (pH, luz, temperatura e quantidade de nutrientes) ou com as características dos próprios organismos (idade e sexo). Os factores antropogénicos estão relacionados com os poluentes industriais, agrícolas ou urbanos provenientes das actividades realizadas pelo Homem.

Os peixes são considerados óptimos bioindicadores, por permitirem rápidas respostas biológicas na presença de substâncias xenobióticas no habitat onde estão inseridos, e desta forma indicarem o grau de contaminação ambiental do sistema onde se encontram. Esta informação é possível, porque estes animais têm a capacidade de acumular contaminantes nos seus tecidos. Uma vez associados ao sedimento de muitos estuários, são frequentemente utilizados como bioindicadores

de poluição de contaminantes persistentes, em contexto de biomonitorização ambiental (Gilliers *et. al.*, 2006).

Neste estudo, o bioindicador utilizado na avaliação do estado ecológico do estuário do Sado foi a espécie *S. senegalensis*.

1.2.2 Biomarcadores

Os biomarcadores podem agir como ferramentas de prognóstico no aumento do nível da poluição e são extremamente relevantes nos estudos de identificação de contaminantes em ambientes aquáticos (Vlachogianni, 2007b).

1.2.2.1 Definição “biomarcador”

A definição de biomarcador tem vindo a evoluir, através de diversos estudos realizados por vários autores. De acordo com a definição clássica de McCarthy e Shugart (1990), os biomarcadores correspondem a mudanças numa resposta biológica, podendo esta ser a nível molecular, celular, fisiológica ou comportamental, relacionada com a exposição a contaminantes no meio ambiente.

Os biomarcadores são instrumentos utilizados na medição dos efeitos biológicos aquando da avaliação da qualidade ambiental. Livingstone (1993), Van Gestel e Van Brummeen (1996) e Van der Oost *et al.* (2003) associam ao termo biomarcador o facto de este poder ser considerado como uma resposta biológica na presença de substâncias tóxicas a nível orgânico, medido no interior do organismo ou a partir dos produtos produzidos pelo seu metabolismo, indicando um desvio do estado normal que não pode ser detectado no organismo inteiro.

1.2.2.2 Uso de biomarcadores em ecossistemas aquáticos

Vários estudos realizados concluíram que os biomarcadores são ferramentas capazes de fornecer informação relativamente ao nível de poluição do local onde estão inseridos, através da ocorrência de respostas biológicas adversas no interior dos organismos aquáticos (Bucheli e Fent, 1995; Vlachogianni *et al.*, 2007a). O uso de biomarcadores tem sido extremamente importante como ferramenta base nos estudos de identificação de contaminantes em ambientes aquáticos, pelo que actualmente, são analisados os comportamentos dos contaminantes e os processos de bioacumulação, biodisponibilidade e biotransformação, assim como os efeitos biológicos e bioquímicos nos organismos aquáticos, induzidos por contaminantes, com o objectivo de avaliar o impacto dos contaminantes presentes em ecossistemas aquáticos (Van der Oost *et al.*, 2003; Au, 2004).

Para que os biomarcadores possam ser usados como “sistema de alerta precoce” e se possam tomar medidas correctivas antes que o ecossistema seja afectado com danos irreversíveis, é crucial que as respostas destas ferramentas sejam adquiridas com tempos de resposta curtos (horas, dias). Os biomarcadores devem ser dotados de várias características tais como a reprodutibilidade, sensibilidade, especificidade, reversibilidade, aplicabilidade em diferentes *taxa* biológicos, facilidade de uso e relação custo/benefício adequado (Cajaraville *et al.*, 2000).

Relativamente à exposição a contaminantes, os biomarcadores têm a vantagem de quantificarem, simplesmente, os poluentes biologicamente disponíveis. Quando é realizada a medição dos efeitos dos contaminantes, os biomarcadores agregam os efeitos de múltiplos factores de stress e elucidam relativamente aos seus

mecanismos. Estas ferramentas são de rápida avaliação e eficácia na identificação do estado de saúde do organismo.

1.2.2.3 Tipos de biomarcadores

De acordo com NRC (1987) e WHO (1993), os biomarcadores podem ser subdivididos em três classes:

- Biomarcadores de exposição que abrangem a detecção e a medição de substâncias exógenas, metabolitos ou produtos de interacção entre o agente xenobiótico e uma molécula ou célula específicas, medidas no interior do organismo.
- Biomarcadores de efeito, que incluem alterações bioquímicas ou fisiológicas de fluidos corporais, nos tecidos de um organismo e que são normalmente associadas a doenças.
- Biomarcadores de susceptibilidade, que indicam a capacidade inerente ou adquirida de um organismo para responder à exposição a uma substância xenobiótica específica, incluindo factores genéticos e mudanças nos receptores que alteram a sensibilidade do organismo a essa exposição.

A análise de biomarcadores de exposição e de efeito é um instrumento fundamental para detectar o impacto da poluição sobre a saúde dos ecossistemas, geralmente em conjunto com outras abordagens para a avaliação da qualidade ambiental, tais como análises químicas convencionais, bioensaios e estudos ecológicos a longo prazo (Cajaraville *et al.*, 2000).

Deste modo, no presente estudo foram utilizadas as metalotioninas, como biomarcadores de exposição e a histopatologia como biomarcador de efeito.

1.2.2.4 Histopatologia como biomarcador de efeito

As alterações do fígado dos peixes têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores histopatológicos (Myers *et al.*, 1998; Mela *et al.*, 2007), por serem ferramentas eficazes na obtenção de respostas realistas quanto ao estado de toxicidade dos indivíduos expostos aos contaminantes. Desta forma, têm sido realizados estudos, com grande relevância, com base na utilização de biomarcadores para a avaliação do risco ambiental e da saúde humana, tendo em conta os processos de bioacumulação e bioampliação de diversos contaminantes nas cadeias tróficas.

As principais alterações observadas no fígado de peixes dependem do tempo de exposição, da concentração das substâncias xenobióticas, do grau de toxicidade, da interação entre contaminantes e das condições fisiológicas dos indivíduos. Os biomarcadores histopatológicos mais comumente identificados são a lipidose, focos de necrose, hemorragias e inflamações.

A presença de lipidose é identificada pela existência de inúmeros vacúolos, que no interior dos hepatócitos armazenaram quantidades significativas de glicogénio, consequência do tipo de alimentação e do excesso de produção de lípidos realizada pelo indivíduo (Groman, 1982; Takashima e Hibiya, 1995).

Os focos de necrose que ocorrem no fígado de peixes são alterações histopatológicas que se evidenciam pela morte de hepatócitos em zonas do tecido hepático. Esta alteração é a manifestação de lesões irreversíveis que destruíram a capacidade funcional das células.

As inflamações são alterações evidenciadas pela hipertrofia e coloração vermelha dos sinusóides (capilares associados aos hepatócitos).

As hemorragias normalmente sucedem-se a evidências mais graves de inflamações e/ou necroses.

1.2.2.5 Metalotioninas como biomarcador de exposição

As metalotioneínas (MTs) são uma classe de proteínas citosólicas de baixo peso molecular (6 – 7 kDa), com uma estrutura composta por uma única cadeia de aminoácidos dos quais 20 são cisteínas, as quais representam cerca de 30% do total de aminoácidos (57-75 aminoácidos) (Viarengo, 1989; Viarengo *et al.*, 1993; Simes *et al.*, 2003 e Vergani *et al.*, 2007). A quantidade de ligantes tiol dos resíduos de cisteína presentes na estrutura da MT confere à proteína uma alta afinidade para iões metálicos livres, tornando estas proteínas de grande interesse sob o ponto de vista bioquímico (Nordberg, 1998; Kagi *et al.*, 1988, Palmiter, 1998). A ocorrência de contaminantes metálicos induz, no organismo exposto, a síntese de MT (Romero-Isartek Vasa, 2002), variando conforme o tipo de metais presentes.

Têm sido feitos inúmeros estudos para determinar a principal função das MTs. No entanto estas proteínas exercem várias funções o que dificulta a sua total compreensão.

As MTs podem ser induzidas por metais essenciais e não essenciais. A indução destas proteínas difere dependendo da natureza do metal e da afinidade de cada um deles pelos grupos grupos sulfidrilos presentes na sua molécula: $Hg^{2+} > Cu^{+} > Ag^{+} > Cd^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{+}$ (Canesi *et al.*, 1999). A presença de um metal com maior afinidade

para as MTs pode resultar na deslocação de um metal previamente ligado a esta proteína. O cádmio é o exemplo de um dos indutores mais fortes de MT (Olsson *et al.*, 1986; Wan *et al.*, 1993). Uma molécula de MT pode estar ligada a 7 átomos de cádmio ou zinco, ou a 12 átomos de cobre (Suzuki *et al.*, 1998). Estas proteínas têm várias isoformas, aparentemente induzidas por metais diferentes, sendo MT-I e MT-II as formas mais conhecidas (Costa *et al.*, 2009c).

Estudos recentes também atribuem às MTs uma função antioxidante, pelo facto destas actuarem como agentes de inactivação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), ou como redutores de níveis citosólicos de metais, como cobre e ferro, libertando o metal Zn, cuja função é dar estabilidade às membranas celulares (Klaassen *et al.*, 1999; Viarengo *et al.*, 1999 e Viarengo *et al.*, 2000).

1.2.3 Contaminação metálica dos sedimentos estuarinos

Os sedimentos presentes nos estuários estão frequentemente sujeitos à contaminação proveniente das actividades antropogénicas. Estes contaminantes tendem a associar-se à matéria particulada e a acumularem-se no sedimento estuarino. Desta forma, o processo de acumulação constitui uma fonte de contaminação metálica para os organismos residentes ou que dependam deste ambiente. Este processo de acumulação ocorre com maior ou menor frequência dependendo das características dos sedimentos, nomeadamente da sua granulometria e composição química.

Os sedimentos contêm água intersticial presente nos espaços entre as partículas, material inorgânico (fragmentos de rochas e conchas), material orgânico, bastante importante nas relações de biodisponibilidade dos contaminantes e por fim, materiais

provenientes das actividades antropogénicas. Os sedimentos são muito importantes nos ecossistemas aquáticos por servirem de habitat a uma ampla variedade de organismos estuarinos e serem fonte de alimento para os organismos bentónicos, inclusive para os organismos de níveis tróficos mais elevados. Têm ainda uma elevada capacidade de captação de contaminantes, sendo que um dos elementos principais destas contaminações são os metais. Os metais traço são introduzidos nos sistemas aquáticos, por processos naturais, no caso da erosão dos solos e das rochas, ou por processos antropogénicos, nos casos já referidos anteriormente, como as actividades industriais, mineiras, entre outras. A elevada toxicidade destes poluentes resulta do facto de serem elementos de transição que formam compostos complexos com diversos elementos orgânicos e inorgânicos, das suas características de persistência e capacidade de acumulação no ambiente e da não biodegradabilidade. Para além das características dos metais, a sua biodisponibilidade e toxicidade dependem de factores como as alterações químicas que ocorrem nas águas intersticiais, o pH, o potencial redox (Eh) e a salinidade (Chapman, *et al.*, 1998).

Para avaliar a qualidade do ambiente sedimentar e determinar eventuais impactes ecológicos associados aos sedimentos, utiliza-se frequentemente a “Tríade de Qualidade Sedimentar” como ferramenta na avaliação do grau de contaminação dos sedimentos estuarinos. Esta abordagem tem três componentes:

- Análises físico-químicas do sedimento (determinação da contaminação química);
- Avaliação da estrutura da comunidade bentónica (determinação do estado da fauna residente com maior exposição aos contaminantes do sedimento);
- Avaliação ecotoxicológica dos sedimentos (avaliação da toxicidade)

A gestão de sedimentos contaminados requer o desenvolvimento de vários critérios biológicos e químicos, com o objectivo de identificar efeitos associados a concentrações acima das quais os sedimentos são considerados problemáticos. Para uma correcta avaliação do tipo de contaminação a que o biota está exposto, é necessária a realização de testes de toxicidade e bioacumulação, por forma a adquirir informação precisa acerca do significado biológico dos poluentes associados aos sedimentos e os seus efeitos nos organismos. Estes testes devem ser efectuados após a realização das análises químicas, que apenas fornecem informação acerca da qualidade do sedimento (Macdonald *et al.*, 1996). A determinação do impacte dos sedimentos contaminados nos organismos é avaliada a partir de índices de qualidade sedimentar (Costa *et al.*, 2010). Existem vários tipos de índices de avaliação da qualidade de sedimentos, indicando de seguida dois dos mais importantes:

- Índices de contaminação, que comparam os contaminantes presentes em estações limpas com os presentes em estações poluídas e agregam as concentrações, por exemplo metálicas (índice de contaminação metálica);
- Índices de risco ecológico que identificam o grau de contaminação dos sedimentos e associam-no à concentração que potencialmente afecta os organismos aquáticos, comparando os valores das concentrações de contaminantes presentes nos sedimentos com os valores guia de qualidade sedimentar (SQG) (Long e Morgan, 1990; Di Toro *et al.*, 1991; Persaud *et al.*, 1992; MacDonald *et al.*, 1992).

A gestão dos sedimentos contaminados pode também ser controlada através da legislação existente. De acordo com a legislação portuguesa (Portaria 1450/2007 de 12 de Novembro) e de acordo com a Convenção de Oslo, relativamente às dragagens, os sedimentos são classificados em cinco classes de acordo com o grau de contaminação por metais (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Ni e Zn), metalóides (As) e compostos orgânicos (PCB, PAH e HCB):

- Classe 1: Material dragado limpo — pode ser depositado no meio aquático ou repostado em locais sujeitos a erosão ou utilizado para alimentação de praias sem normas restritivas.
- Classe 2: Material dragado com contaminação vestigiária — pode ser imerso no meio aquático tendo em atenção as características do meio receptor e o uso legítimo do mesmo.
- Classe 3: Material dragado ligeiramente contaminado — pode ser utilizado para terraplenos ou no caso de imersão necessita de estudo aprofundado do local de deposição e monitorização posterior do mesmo.
- Classe 4: Material dragado contaminado — deposição em terra, em local impermeabilizado, com a recomendação de posterior cobertura de solos impermeáveis.
- Classe 5: Material muito contaminado — idealmente não deverá ser dragado e em caso imperativo, os dragados deverão ser encaminhados para tratamento prévio e/ou deposição em aterro de resíduos devidamente autorizado, sendo proibida a sua imersão.

Na Tabela 1 é apresentada a classificação de materiais dragados de acordo com o grau de contaminação de metais (mg.kg^{-1}) e de compostos orgânicos ($\mu\text{g.kg}^{-1}$).

Tabela 1- Classificação de materiais dragados de acordo com o grau de contaminação de metais (mg.kg^{-1}) e compostos orgânicos ($\mu\text{g.kg}^{-1}$).

Parâmetro	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
Metais					
Arsênio	<20	20-50	50-100	100-500	>500
Cádmio	<1	1-3	3-5	5-10	>10
Crômio	<50	50-100	100-400	400-1000	>1000
Cobre	<35	35-150	150-300	300-500	>500
Mercúrio	<0,5	0,5-1,5	1,5-3,0	3,0-10	>10
Chumbo	<50	50-150	150-500	500-1000	>1000
Níquel	<30	30-75	75-125	125-250	>250
Zinco	<100	100-600	600-1500	1500-5000	>5000
Compostos orgânicos					
PCB (soma)	<5	5-25	25-100	100-300	>300
PAH (soma)	<300	300-2000	2000-6000	6000-20000	>20000
HCB	<0,5	0,5-2,5	2,5-10	10-50	>50

Por outro lado, com o intuito de evitar problemas na saúde humana, tendo em conta os processos de acumulação dos contaminantes presentes em recursos piscícolas consumidos pela população, foram admitidos níveis máximos de contaminação através do Regulamento Europeu 1881/2006 (Tabela 2).

Tabela 2 - Níveis máximos de contaminantes metálicos admitidos em recursos piscícolas para consumo humano, segundo Regulamento Europeu 1881/2006.

Metais	Níveis máximos (mg.kg^{-1} peso húmido)
Chumbo	0,3
Cádmio	0,05
Mercúrio	0,5

De acordo com FAO (2000) foram estabelecidos limites máximos de contaminantes presentes numa série de compostos alimentares, apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Limites críticos de contaminação metálica em peixes e nos seus derivados (EC, 2001a; FDA, 1998).

Substância	Nível Máximo	
	US (ppm)	EU (mg.kg ⁻¹ peso húmido)
Arsénio	76-86	
Cádmio	3-4	0,05-1,0
Chumbo	1,5-1,7	0,2-1,0
Metilmercúrio	1,0	1,0

1.3.4 Stress ambiental

A saúde de um organismo pode ser definida pela capacidade de resistir ao stress: quanto mais exposto ao stress estiver o organismo, menos capacidade de resistência tem. De acordo com Brett (1958), “stress”, ao nível individual da organização ecológica, é o “estado produzido por um factor ambiental ou outro que estende as respostas adaptativas de um animal para além dos limites da normalidade ou que perturba o funcionamento normal de tal forma que as oportunidades de sobrevivência são significativamente reduzidas”. Esta definição é essencialmente consistente com o conceito de stress descrito por Selye (1956) e Fitch e Johnson (1977).

A situação de stress ambiental, associada a múltiplos factores, pode gerar conflitos na obtenção de respostas de um biomarcador. . Esta situação pode tornar as respostas não específicas e, nestes casos, estes instrumentos apresentam respostas aos efeitos de contaminantes que integram os impactes simultâneos de

múltiplas substâncias tóxicas ou factores ambientais sobre o organismo. Neste caso, as medidas não podem ser usadas para identificar a substância tóxica específica.

1.3 Risco para a saúde humana (Factores de bioacumulação (BAF's))

A bioacumulação é um processo que ocorre no interior de organismos expostos a contaminantes, nomeadamente nos sistemas aquáticos, expostos a contaminação metálica, ocorrendo directa ou indirectamente. Este processo ocorre porque os metais traço são elementos dificilmente excretados pelos organismos. O consumo de recursos expostos a contaminantes deste tipo e independentemente de conterem teores baixos de contaminantes pode conduzir, em condições de exposição crónica por consumo continuado, à bioamplificação daqueles teores em níveis superiores da cadeia trófica. Relativamente à espécie humana, ela pode ser afectada, pois os efeitos dos metais bioacumulados nos peixes têm consequências graves para a saúde, podendo provocar alterações do sistema nervoso central, lesões no córtex e no cérebro, bem como alterações nos órgãos do sistema cardiovascular, urogenital e endócrino.

A avaliação de risco toxicológico é uma análise quantitativa da potencial ocorrência de efeitos adversos à saúde humana e ao meio ambiente, causados pela libertação de substâncias perigosas por actividades antropogénicas ou naturais, numa área física delimitada. A análise de risco envolve a estimativa do nível de exposição ao contaminante e a avaliação da toxicidade potencial, a qual pode ser efectuada tendo por base factores de bioacumulação (BAFs) que estimam por exemplo a dose de agentes tóxicos ingerida por seres humanos através do consumo de peixes contaminados.

2. Objectivos

O principal objectivo deste trabalho é avaliar os possíveis efeitos da qualidade do sedimento do estuário do Sado, usando a espécie *Solea senegalensis*, como bioindicador.

São objectivos específicos:

- Avaliar as características do sedimento e a contaminação metálica na área onde esta espécie é capturada, no estuário do Sado;
- Comparar as condições locais com uma área de captura da mesma espécie no estuário do Mira, considerada zona de referência;
- Testar a utilização de dois biomarcadores, um biomarcador de exposição e um biomarcador de efeito para avaliar as possíveis relações entre as condições ambientais e a saúde desta espécie.

3. Materiais e métodos

3.1 Material

3.1.1 Aparelhos

- Balança de precisão (AND, modelo HA-120M, $\pm 0,1$ mg)
- Arca frigorífica, a -80°C
- Centrifuga Beckman, modelo Óptima
- Polarógrafo diferencial por impulsos, com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa - equipado com o processador 693 VA combinado com a plataforma 694 VA (Metrohm, Herisan, Suíça)
- Micrótopo (Jung RM2035, Leica, Alemanha)
- Microscópio (modelo DMLV, da Leica Microsystems)
- Imagens capturadas, tratadas com o software Imagem J 1.4 (Instituto Nacional de Saúde de Wayne Tansband, Bethesda, MD, USA)
- Espectrómetro Thermo Elemental X-Series

3.1.2 Reagentes

- Solução de TRIS-HCL 0,02M (pH 8.6)
- Solução cobalto
- Solução de Triton
- Solução padrão de MT de coelho (isoformas I e II) (Sigma, St Loui, MO, USA)
- Água ultra pura Mili-Q (dH_2O)
- Solução ácida (dH_2O + HCl 37% 3:1 v/v)
- Fixador de Bouin (37% de formaldeído e 100% de ácido acético, ao qual foi adicionado ácido pícrico até à saturação)

- Água destilada
- Etanol a 70% (diluído com dH₂O)
- Etanol a 96%
- Etanol a 100%
- Xilol
- Parafina
- Hematoxilina e eosina alcoólica
- Resina DPX
- Pirofosfato
- Mistura de ácidos (6mL HF 40%, v/v ao qual foi adicionado 1mL de mistura de HCl a 36% com HNO₃ a 60% 3:1 v/v: *aqua regia*)
- Ácido nítrico (HNO₃)
- Sedimento de referência MESS-3 (NRC, Canada)

3.1.3 Material

- Craveira ($\pm 0,02$ mm)
- Régua
- Tesoura
- Bisturi
- Pinças metálicas
- Tubos de eppendorf
- Placas metálicas
- Lâminas
- Frascos Teflon

Todo o material utilizado na realização dos procedimentos laboratoriais, para avaliação da toxicidade nos órgãos da espécie *S. senegalensis*, foi previamente lavado com água e detergente, de seguida passado com água Milli-Q, mergulhado em ácido nítrico diluído durante 24 horas, passado de novo com água Milli-Q e, finalmente, seco na estufa a 58°C, para garantir a descontaminação total e minimizar o risco de contaminação.

3.2 Resumo da metodologia de análise utilizada

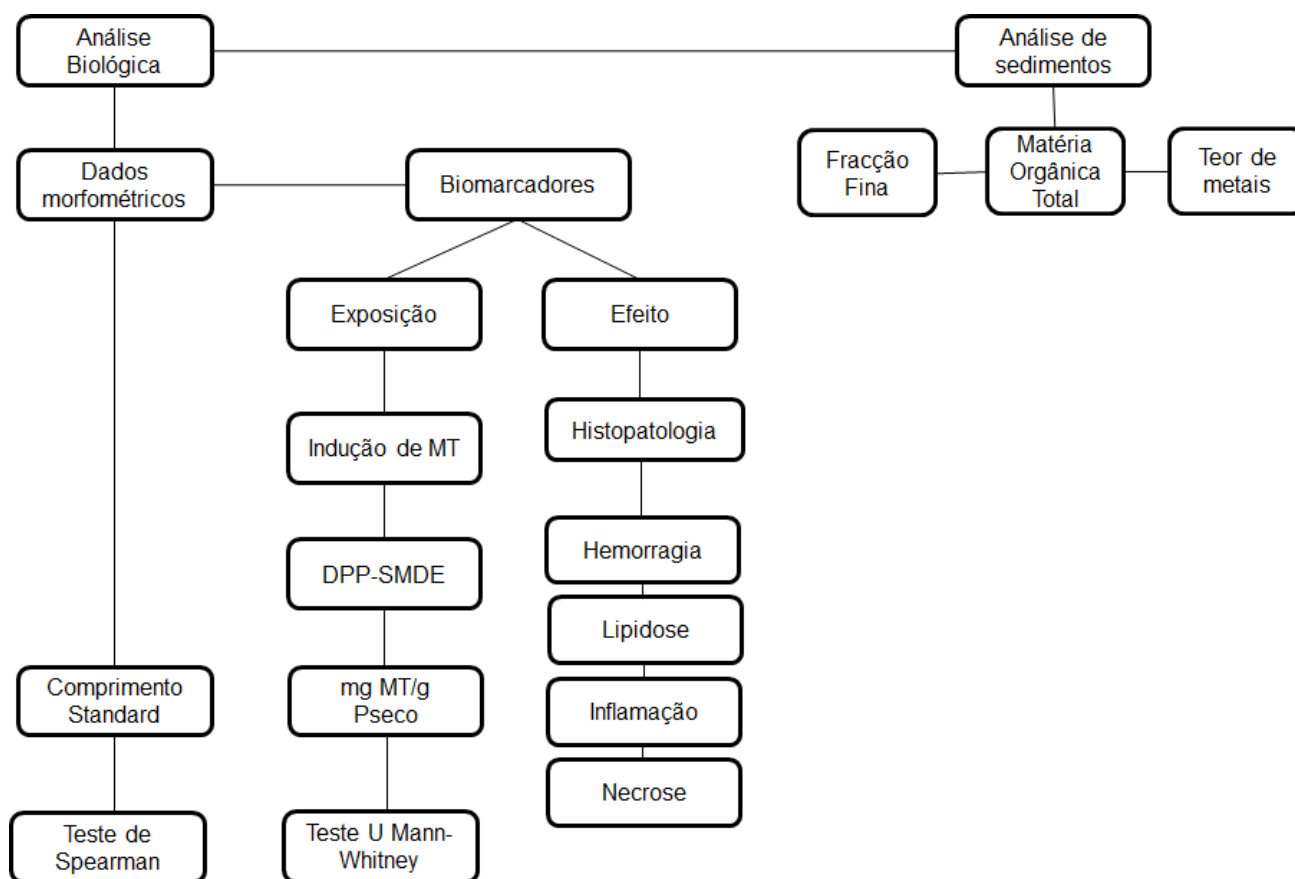


Figura 1- Metodologia aplicada na avaliação da qualidade sedimentar.

A Figura 1 apresenta o resumo da metodologia aplicada no presente trabalho. Para avaliar a contaminação presente nas zonas amostradas foram realizados dois tipos de análises: biológica e físico-química.

A análise biológica dividiu-se em duas partes: medições do comprimento standard dos indivíduos amostrados e identificação de biomarcadores. Consideraram-se dois tipos de biomarcadores, os níveis de metalotioninas, que foram medidos através do método DPP-SMDE e biomarcadores histopatológicos, através da identificação microscópica de quatro tipos diferentes de marcadores (hemorragia, inflamação, necrose e lipidose). Após a determinação destes parâmetros, foram efectuados testes estatísticos que os relacionaram, com o objectivo de obter informação sobre a contaminação dos estuários através dos efeitos biológicos adversos. A análise de sedimentos complementou a análise biológica.

3.3 Amostragem

A área de estudo escolhida foi o estuário do Sado. Foi realizada a análise da qualidade ecológica dos recursos piscícolas deste local, nomeadamente da espécie *S. senegalensis*, quanto ao nível de contaminação desta espécie, por influência da poluição proveniente das actividades antropogénicas desenvolvidas nas margens do estuário. O estuário do Mira serviu como área de controlo, tendo sido alvo do mesmo tipo de avaliação que o estuário do Sado

Para tal foram recolhidos vários exemplares da espécie *S. senegalensis* e amostras de sedimento de cada um dos estuários. A amostragem do estuário no Sado foi realizada na área indicada a vermelho na Figura 2. A zona de amostragem no estuário do Mira situou-se num viveiro próximo de Foros de Galeado, indicada a vermelho na Figura 3. Durante o período de amostragem este viveiro realizava pesca regular, sendo todos os exemplares com valor económico introduzidos no mercado, nomeadamente o linguado.



Figura 2 - Localização geográfica da zona de amostragem no estuário do Sado. Próximo da cidade de Setúbal e da zona industrial da península de Mitrena. Coordenadas GPS: 38°48'78" w : 08°84'64".



Figura 3 - Localização geográfica da zona de amostragem de sedimentos na estação do estuário do Mira, inserido no viveiro da zona de Foros de Galeado. Coordenadas GPS N: 37°43' 84" W: 08°45' 22".

A amostragem biológica realizou-se em Setembro de 2010 e a de sedimentos em Janeiro de 2011. Os linguados foram capturados com redes de arrasto de profundidade, sendo na maioria indivíduos juvenis e na sua totalidade indivíduos da espécie *S. senegalensis*. Os animais foram transferidos para o laboratório em

condições semelhantes às dos locais de proveniência, por forma a minimizar possíveis alterações estruturais dos órgãos, através do processo natural de degradação celular.

As amostras de sedimentos são constituídas por sub-amostras, recolhidas nas áreas assinaladas nas Figuras 2 e 3. Os sedimentos frescos foram homogeneizados, obtendo-se uma amostra composta para cada área, e imediatamente congelados para análises posteriores.

3.3.1 Caracterização geral dos ecossistemas amostrados

3.3.1.1 Estuário do Sado

O estuário do Sado localiza-se na Costa Oeste de Portugal, na Península de Setúbal, sendo o segundo maior estuário de Portugal. Possui uma área aproximada de 160 km², tem um comprimento de 20 km e uma largura média de 8 km. A profundidade média é 8 m, sendo a máxima da ordem dos 50 m (Mohid, 2000). A maré é do tipo semi-diurno com amplitudes que variam de três a dois metros em maré viva a um a dois metros em maré morta. O caudal médio anual do rio é de cerca de 40 m³.s⁻¹, apresentando forte variabilidade sazonal, com valores médios diários inferiores a um m³.s⁻¹ no Verão e superiores a 150 m³.s⁻¹ no Inverno (Cabeçadas e Brogueira, 1993).

Parte importante do estuário, uma área aproximada de 24000 ha, está classificada como Reserva Natural, mas existem muitas indústrias, principalmente na margem norte, que enviam os seus efluentes contaminados para o interior do estuário. As áreas envolventes ao estuário são utilizadas para a agricultura, nomeadamente para

a produção de arroz e tomate, extracção salineira, e para produção intensiva de peixe (aquacultura) (Caeiro *et al.*, 2003).

Do ponto de vista morfológico, o estuário pode dividir-se em duas regiões com características distintas: o estuário e o Canal de Alcácer. A região do estuário propriamente dita apresenta uma topografia complexa, com extensas zonas de espraiaços de maré e sapais a montante e dois canais a jusante separados por bancos de areia. Estes bancos de areia individualizam um canal a Norte e um canal a Sul com características hidrodinâmicas diferentes. Os espraiaços de maré e sapais de montante ocupam cerca de um terço do estuário e encontram-se, na sua grande maioria, integrados na Reserva Natural do Estuário do Sado, bem como grande parte do Canal de Alcácer e região envolvente, a qual é constituída, essencialmente, por zonas agrícolas e florestais. Nesta zona, a pesca e a aquacultura são actividades económicas importantes. O rio Sado entra no estuário através do Canal de Alcácer, ao longo do qual a maré se propaga por cerca de 20 km.

O canal Norte estende-se desde o canal de Águas de Moura e zona industrial da Mitrena até à cidade de Setúbal. Esta é a zona que mais influencia este canal, relativamente à contaminação do estuário. Constituída por 100 000 habitantes, a cidade de Setúbal é responsável pela grande pressão antropogénica sobre o estuário, devido às diversas actividades económicas implementadas para suporte da população, nomeadamente as actividades pesqueiras, a exploração de sal e de bivalves, aquacultura, actividade agrícola, (principalmente a cultura de arroz), o turismo e ainda a intensa actividade industrial. As descargas dos efluentes urbanos e industriais são efectuadas através deste canal, que regista uma profundidade

máxima de 15 m e uma reduzida hidrodinâmica, apresentando pior qualidade da água que o canal Sul, área menos intervencionada que o canal Norte.

O canal Sul estende-se desde a Comporta, em direcção a Tróia, tem profundidade máxima de 35 m e possui forte hidrodinamismo. A intensidade das correntes promove a oxigenação das águas e a diluição de poluentes, oferecendo também uma grande variedade de alimento e, conseqüentemente, é o habitat de muitas espécies.

O risco da alteração do equilíbrio ecológico do estuário do Sado advém, em larga medida, dos efluentes despejados para este sistema, provenientes das actividades realizadas na cidade de Setúbal e respectiva cintura industrial. Estes efluentes são caracterizados por terem, na sua composição, vários poluentes como os TBT's (tributil de estanho), os PCB's (bifenilos policlorados), o DDT (diclorodifeniltricloroetano) e metais principalmente nos efluentes industriais, cargas orgânicas elevadas, fosfatos, nitratos, amónia e uma potencial contaminação da água por bactérias ou vírus, com origem maioritariamente nos efluentes urbanos. Descargas consideráveis de fertilizantes e pesticidas originários das actividades agrícolas são ainda fontes importantes, bem como as escorrências das antigas minas de Aljustrel. Águas superficiais de escorrência, motivadas pela rega excessiva e a precipitação irregular são potencialmente perigosas para a qualidade ambiental do estuário, influenciando a sua funcionalidade e desempenho biológico. O facto da circulação das águas ser menor nesta zona norte influencia o comportamento das substâncias perigosas negativamente, uma vez que estas mantêm ligações entre si e com os sedimentos do estuário, contaminando as espécies que procuram alimento neste local. Estas substâncias têm a capacidade de se acumular ao longo da cadeia

trófica, tornando-se mais prejudiciais para os animais do topo da cadeia alimentar, como os golfinhos roazes e o Homem.

A margem sul, perto da península de Tróia, é o canal menos poluído, devido à influência de correntes intensas, cuja circulação das águas provoca uma maior mistura dos contaminantes existentes.

As dragagens são a ameaça mais recente para o estuário do Sado, já que têm nefastas consequências na vida estuarina. A contaminação da água e dos sedimentos são um dos potenciais efeitos das dragagens, resultantes da ressuspensão de sedimentos que contém contaminantes metálicos e orgânicos e da sua posterior deposição em zonas não contaminadas (ou menos contaminadas). O aumento da matéria em suspensão na água provoca o aumento da turbidez, e por diminuição da luminosidade poderá haver alteração da fotossíntese que prejudica a cadeia alimentar. A dispersão dos sedimentos faz com que os agentes tóxicos e patogénicos, que se encontram depositados nas zonas dragadas, afectem zonas não contaminadas, e deste modo são provocadas perturbações nos ciclos biológicos das espécies presentes no Estuário do Sado.

3.3.1.2 Estuário do Mira

Localizado na costa sudoeste de Portugal, o estuário do Mira caracteriza-se por se estender entre duas cidades pequenas, Vila Nova de Milfontes na embocadura e Odemira no limite superior e ser um estuário estreito, com 32km de comprimento e 150 m de largura, na zona mais larga e 30 m de largura por 6m de comprimento na zona superior (Costa *et al.*, 1994b). A profundidade média do estuário é cerca de 6 m e a máxima de 11 m. Na zona terminal, junto a Vila Nova de Milfontes, ao longo

de cerca de dois km, a batimetria é complexa, apresentando bancos de areia que ficam a descoberto em baixa-mar. Ao longo das margens, até cerca de 20 km a montante da embocadura, existem espraiaços de maré, a maioria dos quais alberga zonas de sapal.

A maré é a principal força promotora de escoamento no estuário, essencialmente do tipo semi-diurna e com amplitude entre um metro em maré morta e três a dois metros em maré viva. O padrão do escoamento é mais complexo na zona próxima da embocadura, onde a velocidade à superfície pode atingir valores superiores a um m.s^{-1} . A maré é amplificada na primeira parte do estuário, devido à diminuição da largura e da profundidade e diminui na zona de montante devido ao atrito. As marés têm uma importante influência na estratificação vertical dos factores químicos e físicos da coluna de água, nomeadamente a salinidade e turbidez (Andrade, 1986).

De acordo com Andrade (1986), o gradiente do estuário do Mira é caracterizado por, de jusante para montante: a) diluição da salinidade; b) aumento da turbidez; c) diminuição do diferencial térmico em relação à atmosfera; d) diminuição do conteúdo do oxigénio dissolvido (percentagem de saturação). Verticalmente, o gradiente estuarino, desde a superfície até à profundidade, é caracterizado por: a) aumento da salinidade, b) aumento da turbidez; c) aumento do diferencial térmico em relação à atmosfera; d) diminuição do conteúdo do oxigénio dissolvido (percentagem de saturação). As oscilações físicas e químicas do estuário da Mira são resultado de vários factores, tais como a morfologia do estuário, a ausência de irregularidade na secção terminal do rio, quase 45 km, facilita a penetração dinâmica a montante das marés; a precipitação nos meses de Janeiro e Março; e a redução anual do

escoamento, aproximadamente 30%, devido à barragem de Santa Clara-a-Velha (Andrade, 1986).

Relativamente à temperatura, existem também algumas oscilações ao longo do estuário. Perto da embocadura do rio, zona predominantemente marinha, a faixa da temperatura apresenta-se mais estreita variando de 12 a 22,5°C e salinidade de 27 a 35 psu (valores anuais). Na zona superior do estuário o intervalo de temperatura tem uma maior variação (8-25°C) e de salinidade (0-23psu), já que sofre influência de intrusões de escoamento (Costa *et al.*, 1994b).

A bacia hidrográfica do Rio Mira tem uma área total com cerca de 1576 km², delimitado a norte pela bacia hidrográfica do rio Sado, e a sul pela bacia hidrográfica de pequenos rios do Algarve, a Este pela bacia hidrográfica do rio Guadiana e a Oeste pelo Oceano Atlântico (Loureiro *et al.*, 1984, Adão, 2003). A envolvência do estuário insere-se no “Parque Natural do Sudoeste Alentejano e Costa Vicentina”, caracterizado por campos de regadio e matas produtivas, de eucaliptos e zona de montado. O clima circundante é um regime sub-húmido, sendo a época seca de Maio a Setembro e a estação húmida de Outubro a Abril. A temperatura atmosférica anual varia entre 20-21°C, nos meses de Junho e Agosto, no período mais quente e 8-11°C em Dezembro e Janeiro, no período mais frio. A precipitação anual é de 667 mm e a insolação anual é aproximadamente 2950 horas (Loureiro, *et al.*, 1984.)

As características citadas anteriormente fazem com que o estuário do Mira seja considerado um estuário bem conservado e próximo do que seria um estuário primitivo e sem influências humanas.

3.4 *Solea senegalensis*

3.4.1 Caracterização da espécie

A espécie *S. senegalensis*, cujo nome comum é linguado-branco, é uma espécie de peixe teleósteo comum no estuário do Sado, com elevado valor como recurso para a pesca e aquacultura (Dinis *et al.*, 1999). Este peixe uma espécie bentónica, que utiliza o estuário como berçário para os indivíduos juvenis. Esta espécie costuma permanecer em fundos arenosos ou lodosos e alimenta-se de pequenos invertebrados, como crustáceos e moluscos (Cabral e Costa, 1999; Cabral, 2000; Sá *et al.*, 2003). A morfologia dos linguados é consideravelmente diferente dos peixes comuns: têm um corpo oval e achatado, a posição dos olhos é assimétrica, a cor do manto superior é acastanhada, e tem a particularidade de poder modificar-se devido aos mecanismos de mimetismo do indivíduo. O comprimento máximo encontra-se, geralmente, entre os 50 cm, podendo atingir entre 2 e 3 kg.



Figura 4 - Representação fotográfica do linguado da espécie *Solea senegalensis*.

3.4.2 *Solea senegalensis* como bioindicador

Os peixes são um excelente exemplo de bioindicadores. São organismos sensíveis capazes de responder a factores negativos evidentes num local contaminado e funcionar eficazmente na identificação de substâncias xenobióticas existentes no habitat envolvente (Gilliers *et. al.*, 2006). A espécie *S. senegalensis* tem sido largamente utilizada como modelo biológico, em estudos de toxicologia ambiental, funcionando como indicador de contaminação ambiental. A vantagem da sua utilização como bioindicador deve-se à sua relativa abundância e ao seu modo de vida e alimentação, já descritos anteriormente, que contribuem para que seja uma importante espécie sentinela na biomonitorização da contaminação ambiental, nomeadamente na avaliação dos sedimentos do estuário (Jiménez-Tenório *et al.*, 2007). Como tal, o bioindicador utilizado na avaliação da contaminação do estuário do Sado foi o peixe da espécie *S. senegalensis*.

3.4.3 Fígado

No ambiente aquático, os peixes teleósteos absorvem os contaminantes através de vários processos, sendo a alimentação uma das vias principais. Quando incorporados no organismo, grande parte dos contaminantes são acumulados pelo fígado dos animais e sofrem um processo de biotransformação através de enzimas que modificam estes contaminantes em matéria hidrossolúvel, quando possível, para que o organismo os consiga excretar (Heath, 1997).

3.4.3.1 Arquitectura do parênquima hepático

O fígado dos peixes é extremamente importante por ser um órgão de grande actividade metabólica, onde se acumulam as substâncias xenobióticas. O fígado é constituído por células designadas por hepatócitos. Estas são células endoteliais

(Takashima e Hibiya, 1995), com formato poliédrico, providas de um ou mais núcleos centrados no seu interior, nucléolos geralmente evidentes e o citoplasma apresenta granulações, podendo apresentar vacúolos, dependendo do estado nutricional do indivíduo. O fígado é percorrido por capilares sanguíneos extremamente finos designados por sinusóides, que se ligam a ramificações das veias porta e supra-hepática. Os sinusóides são compostos por células hepáticas, cujas funções vitais envolvem a secreção da bilis, processos de metabolismo de proteínas, lípidos e carboidratos.

3.4.4 Análise biológica dos organismos

No total, obtiveram-se 21 exemplares recolhidos no estuário do Sado e 4 no estuário do Mira. No laboratório foi iniciada, de imediato, a análise dos exemplares recolhidos; foi efectuada a medição do comprimento standard (C_s) de cada animal, com o auxílio de uma craveira ($\pm 0,02$ mm), e de uma régua no caso dos indivíduos de maior dimensão. O peso húmido total do peixe (P_t) e dos órgãos a analisar foi obtido recorrendo a uma balança de precisão (AND, modelo HA-120M, $\pm 0,1$ mg).

De seguida, procedeu-se à dissecação dos organismos, para recolher o fígado.

A extracção do fígado foi efectuada através de um corte da secção cervical, tendo sido utilizados materiais adequados (tesoura e bisturi) e manuseados com pinças metálicas devidamente descontaminadas. A identificação dos exemplares seguiu uma estratégia aleatória de amostragem, tendo sido efectuada a partir de um código específico (por exemplo: SSS01), em que foi identificada a espécie *S. senegalensis* (SS), a estação (S – Sado e M- Milfontes) e o número do indivíduo (01 até n).

As amostras de fígado foram divididas em várias fracções para serem utilizadas nas diferentes análises a que seriam submetidas.

Os tecidos para análises químicas e bioquímicas foram então colocados em tubos de eppendorf, devidamente identificados e guardados numa arca frigorífica, a -80°C, até serem analisados.

3.4.5 Quantificação de MT no fígado de *Solea senegalensis*

Após retiradas da arca frigorífica a -80°C, as amostras para a quantificação de MTs foram pesadas (P_{af}) e processadas de acordo com Costa *et. al.*, (2008a). Foi adicionada uma solução de TRIS-HCL 0,02M (pH 8.6) às amostras que foram homogeneizadas no frio. O homogenato de cada amostra foi submetido à primeira centrifugação efectuada a 17000rpm a 4°C durante uma hora, em vácuo, numa centrífuga Beckman, modelo Óptima. O sobrenadante, resultante desta primeira centrifugação, foi exposto a um aumento de temperatura, através de um banho-maria a 80°C, durante dez minutos, com o intuito de desnaturar proteínas não-termoestáveis. Os tubos foram tapados com parafilme para evitar a evaporação da amostra. Após uma segunda centrifugação, nas condições da anterior, as amostras foram colocadas a uma temperatura de -4°C.

A análise de MTs foi efectuada pela quantificação de tióis (compostos com elevada capacidade de ligação ao mercúrio) existentes no citosol das amostras tratadas termicamente, de acordo com Diniz *et. al.*, (2007). Para tal, a cada 250 µl de amostra, adicionou-se 20 ml de solução cobalto e 250 µl de solução de Triton e recorreu-se ao uso de um polarógrafo diferencial por impulsos, com eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (DPP-SMDE - Differential pulse polarography – Static

drop Mercury electrode), equipado com o processador 693 VA combinado com a plataforma 694 VA (Metrohm, Herisan, Switzerland). A polarografia permite medir a concentração de MTs presente em cada amostra (Costa *et. al.*, 2010). Adicionou-se uma solução padrão para a detecção e quantificação de MTs, através de duas adições de 250 µl de 10mg.l⁻¹ de MT de coelho (isoformas I e II) (Sigma, St Louis, MO, USA). Os resultados foram expressos em equivalentes de MT de coelho em mg.g⁻¹ de peso seco de homogenato de fígado. O procedimento da extração e quantificação de MT através de DPP-SMDE utilizando MT de coelho como padrão, foi adaptado para MT de *Solea senegalensis* de acordo com Bebianno e Langston (1999). Entre cada análise, o copo e os eléctrodos do polarógrafo foram limpos com dH₂O e solução ácida (dH₂O + HCl 37% 3:1 v/v).

3.4.6 Análise Histológica do tecido hepático

A histologia segue um procedimento rigoroso e consecutivo de tratamento de amostras até à sua efectiva realização. As amostras foram preparadas para análises histológicas, recorrendo a Martoja e Martoja (1967). Primeiramente, é efectuada a fixação das amostras de tecido, de seguida a lavagem consecutiva das mesmas, a desidratação e por fim a coloração. Imediatamente após dissecação, as amostras de fígado foram colocadas no fixador de Bouin (37% de formaldeído e 100% de ácido acético, ao qual foi adicionado ácido pícrico até à saturação), onde permaneceram 48 horas, à temperatura ambiente. As amostras foram posteriormente lavadas durante 24 horas para remover o ácido pícrico em excesso, e para tal foram efectuados vários banhos com água destilada.

Após as lavagens, as amostras foram desidratadas através de uma série de banhos em diferentes tipos de álcoois, de modo a substituir o líquido intersticial das células

por xilol, preservando desta forma a estrutura e a dureza do órgão. Os álcoois utilizados foram o etanol a 70% (diluído com dH₂O), etanol a 96%, etanol a 100% e xilol. Por fim, foram embebidas em parafina, previamente liquefeita na estufa a 58°C, efectuados os blocos para os cortes histológicos, com auxílio de duas placas metálicas e devidamente identificados. Para facilitar os cortes histológicos, criou-se uma secção trapezoidal na extremidade dos blocos de parafina. No micrótomo (Jung RM2035, Leica, Alemanha) foram realizados cortes com uma espessura de 5 µm, transferidos para um banho-maria, durante 5 segundos, e por fim colados cerca de 6 a 12 cortes por cada lâmina. Para garantir boas visualizações dos cortes, foram efectuadas duas lâminas por cada órgão.

Os passos seguintes foram dedicados à desparafinação, coloração e desidratação das amostras. Primeiro foram efectuados banhos sucessivos em diferentes álcoois diminuindo gradualmente a concentração dos mesmos, depois efectuada a coloração em hematoxilina e eosina alcoólica e por fim efectuados banhos sucessivos aumentando gradualmente a concentração dos álcoois, para ser substituído o líquido intersticial por xilol e conservar, desta maneira, as estruturas celulares das amostras. As montagens definitivas dos tecidos animais foram efectuadas com adição de resina DPX nas lâminas previamente preparadas.

A observação das lâminas foi efectuada para analisar potenciais lesões celulares existentes no fígado e para a confirmação da precisão na identificação das características histológicas. O microscópio utilizado nas observações foi o modelo DMLV, da Leica Microsystems, utilizado em todas as análises. A análise das imagens captadas pelo microscópio foi efectuada a partir do software de Imagem J 1.4 (Instituto Nacional de Saúde de Wayne Tansband, Bethesda, MD, USA).

3.5 Análise dos sedimentos

A análise dos sedimentos foi realizada através da determinação da fracção fina (FF), da matéria orgânica total (TOM) e da contaminação metálica.

A matéria orgânica total (TOM) foi quantificada por combustão completa do sedimento seco a $500 \pm 50^{\circ}\text{C}$, durante 4 horas. A fracção fina (FF, tamanho de partícula $<63 \mu\text{m}$) foi obtida por crivagem hidráulica, após a remoção da matéria orgânica com H_2O_2 , lavagem e desagregação por pirofosfato. As duas componentes, FF e TOM, são apresentadas em percentagem de peso seco do sedimento (p_s).

Para a determinação dos metais presentes nos sedimentos, as amostras secas foram completamente mineralizadas com uma mistura de ácidos (6ml HF 40%, v/v ao qual foi adicionado 1ml de mistura de HCl a 36% com HNO_3 a 60% 3:1 v/v: *aqua regia*) durante 1 hora a 100°C em frascos Teflon fechados. O conteúdo dos frascos Teflon evaporou até secar quase totalmente, redissolveu-se em HNO_3 , aqueceu-se durante 20 minutos a 75°C e, por fim, foi realizada uma diluição em 50ml com água ultra pura Milli-Q (Caetano *et al.*, 2007). A determinação dos metais (Arsénio (As), Cádmio (Cd), Crómio (Cr), Cobre (Cu), Chumbo (Pb) e Zinco (Zn)) seria realizada no IPIMAR- INRB, por espectrometria de massa ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry), utilizando um espectrómetro Thermo Elemental X-Series. O método foi validado pela utilização de brancos e sedimento de referência MESS-3 (NRC, Canada). Os resultados seriam apresentados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de sedimento seco.

Não tendo sido possível efectuar as leituras das concentrações dos contaminantes metálicos (Cd, Cu, Pb, Cr, Ar e Zn) em tempo útil, na avaliação da qualidade sedimentar do presente estudo, optou-se pela utilização de dados históricos

existentes e determinados em estudos prévios nas mesmas zonas de amostragem. As concentrações dos contaminantes metálicos presentes na zona de amostragem do Sado foram previamente determinados por Caeiro *et al.*, (2005). Os valores das concentrações de metais da zona de referência foram gentilmente cedidos pelo IPIMAR-INRB (Caetano, comunicação pessoal). Foram utilizadas as concentrações máximas e mínimas obtidas nos estudos prévios na determinação de contaminantes metálicos, por abrangerem uma maior representatividade da contaminação das zonas amostradas.

O quociente SQG-Q foi calculado para avaliar o potencial impacte de efeitos adversos biológicos observados nos sedimentos testados. Este quociente é baseado nos valores guia para águas costeiras, nomeadamente o valor TEL (*Threshold Effects Level*, o nível abaixo do qual não deverão haver efeitos adversos) e PEL (*Probable effects level*, o nível acima do qual se deverão verificar efeitos adversos para os organismos) (MacDonald *et al.*, 1996). Estes valores guia têm sido amplamente utilizados em estudos de avaliação de risco em sedimentos estuarinos. O índice calculado para todos os contaminantes para cada estação de amostragem é dado pela fórmula (Long e MacDonald 1998):

$$PEL-Q_i = \frac{C_i}{PEL} [1]$$

onde PEL é o valor guia para o contaminante *i* e *C_i* é a medida de concentração do contaminante existente no sedimento. O valor SQG-Q (sediment quality guideline quotient indice) foi calculado para comparar o impacte nas duas estações pelas misturas descritas por Long e MacDonald (1998):

$$SQG-Q = \frac{\sum_{i=1}^n PEL-Q_i}{n} [2]$$

onde PEL-Q_i é o índice derivado da equação [1], para o contaminante i e n é o numero de contaminantes em análise. As estações foram avaliadas de acordo com o potencial total de observação de efeitos biológicos adversos, de acordo com MacDonald *et. al.* (2004):

- SQG-Q <0,1 – ausência de impacto
- 0,1 ≤ SGQ-Q <1 – nível moderado de impacto
- SQG ≥ 1 – nível elevado de impacto

3.6 Análise estatística

Após a invalidação da homogeneidade das variâncias calculada através do teste paramétrico de Levene, a análise estatística dos dados foi realizada através de métodos não paramétricos:

- Teste U de Mann-Whitney, para a determinação das diferenças entre variáveis independentes (estação) e variáveis dependentes (MTs e Cs dos indivíduos *S. senegalensis*)
- Teste de Spearman para avaliar as correlações entre os valores de MT e de Cs, tanto nas duas estações como em cada uma delas

O nível de significância estabelecido foi de 5% para todas as análises. Todas as estatísticas foram realizadas através do software Statistica 6.0 (Starsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

4. Resultados

4.1 Dados morfométricos

Na tabela 4 são apresentados os resultados da análise morfométrica dos organismos, relativamente às duas estações amostradas.

Tabela 4- Comprimento standard médio e desvio padrão associado dos linguados

Comprimento standard médio (mm)	
Sado	184,29±14,04
Mira	233,25±96,19

A comparação entre as características físicas dos indivíduos amostrados nas duas estações permitiu observar algumas diferenças entre eles. Relativamente às dimensões dos peixes, na amostragem do Sado os comprimentos dos linguados apresentaram-se idênticos entre si, ao contrário dos indivíduos da amostragem do Mira. No Anexo 1 estão representados os comprimentos standard dos indivíduos amostrados nas duas estações através das Tabelas 12 e 13.

4.2 Quantificação de metalotioninas no fígado de *Solea senegalensis*

Após a leitura das concentrações equivalentes de MT (mg.l^{-1}) no polarógrafo DPP-SMDE, calcularam-se os teores de MT associado ao peso seco de cada amostra. Posteriormente foram calculadas as médias e os desvios padrão do total dos indivíduos amostrados. Na tabela 5 são representados os teores de MT (mg.g^{-1} peso seco) para a estação do Sado e do Mira.

Tabela 5 - Concentração de metalotioninas no fígado de *Solea senegalensis* (mg.g⁻¹ peso seco)

Concentração média de MTs no fígado de indivíduos <i>S. senegalensis</i> (mg.g ⁻¹ peso seco)	
Sado	2,98±1,51
Mira	2,54±1,78

A Figura 5 representa as concentrações médias de MTs no fígado dos indivíduos amostrados nos dois estuários. Não houve grandes diferenças entre os indivíduos dos dois estuários. Nas Tabelas Tabela 14 e 15 do Anexo 1, é possível observar graficamente as concentrações de MTs de todos os indivíduos amostrados nas duas estações.

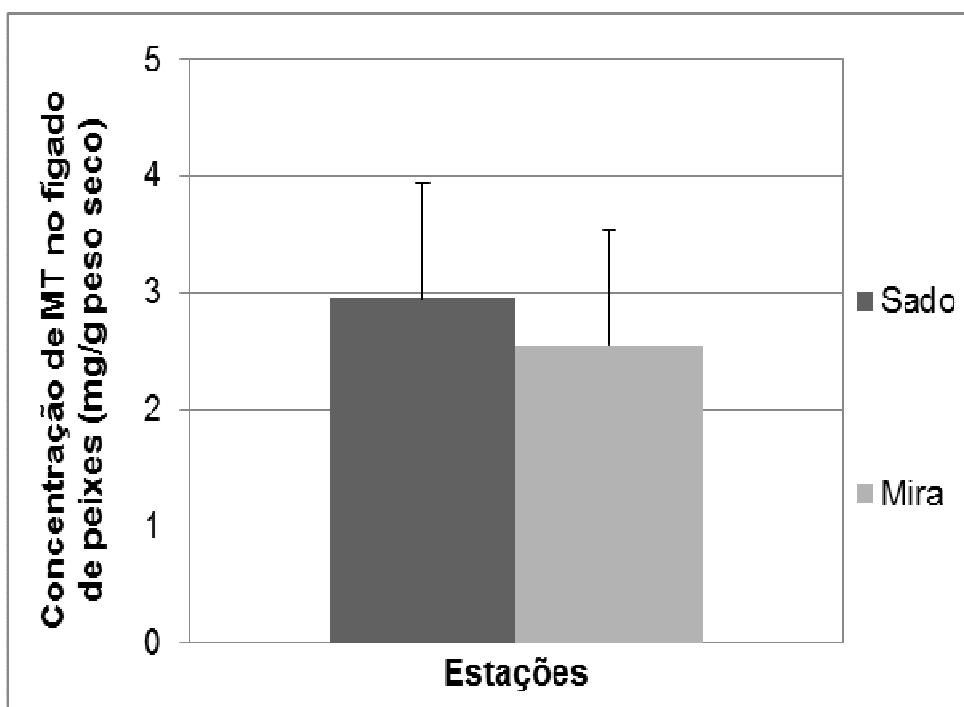


Figura 5- Comparação dos níveis médios de concentração de MT (mg.g⁻¹ peso seco) e respectivos desvio padrão, nas zonas de amostragem (Sado e Mira).

4.3 Análise Histológica

De acordo com o protocolo anteriormente descrito, a análise histopatológica foi efectuada através de observação de cortes do fígado da espécie *S.senegalensis*. Para tal, foram considerados quatro biomarcadores histopatológicos com a finalidade de identificar as lesões ocorridas com a exposição destes organismos à contaminação. Foram analisados três indivíduos de cada estação e considerados quatro biomarcadores distintos (alterações histopatológicas), relativos a quatro padrões de reacção (Tabela 6).

Tabela 6 - Resumo de alterações histopatológicas analisadas no fígado da espécie *S.senegalensis* (adaptado de Costa et al., 2009c).

Padrão de reacção	Alteração histopatológica
Distúrbios na circulação sanguínea	Hemorragia
Resposta Inflamatória	Dilatação e proliferação de vasos sanguíneos
Alteração regressiva	Necrose
Alteração progressiva	Lipidose

Nos resultados obtidos foram detectadas divergências entre as duas estações analisadas. Na estação da Sado, a maioria dos indivíduos apresentou cirrose lipídica e alguns focos de necrose ao longo do tecido (parênquima) hepático, principalmente em torno das ramificações da veia hepática. A presença de sinusóides no parênquima hepático foi constantemente verificada, assim como a presença

excessiva de glóbulos vermelhos no interior das células. Em alguns casos, observou-se ainda a presença de melanomacrófagos em zonas com evidência de focos necróticos. Houve evidência de hemorragia num organismo, identificada pela intrusão de glóbulos vermelhos no parênquima hepático como consequência da ruptura de vasos sanguíneos (Fig. 7C).

Os indivíduos correspondentes à estação do Mira apresentaram fígados normais, apresentando parênquima hepático estruturalmente bem definido em cordões hepáticos, com hepatócitos regulares, de morfologia aproximadamente poliédrica e dimensões homogêneas, com núcleo concêntrico bem definido (Figs 6A e 6B). No entanto, observou-se alguma inflamação, evidenciada pela proliferação e dilatação de sinusóides. No entanto, a frequência de ocorrência de alterações histopatológicas no fígado dos peixes da estação do Mira foi, em geral, baixa, comparativamente aos organismos amostrados no Sado.

A Tabela 7 resume as observações histopatológicas obtidas nos seis indivíduos (três de cada estação) e a apreciação qualitativa dos biomarcadores presentes em cada um.

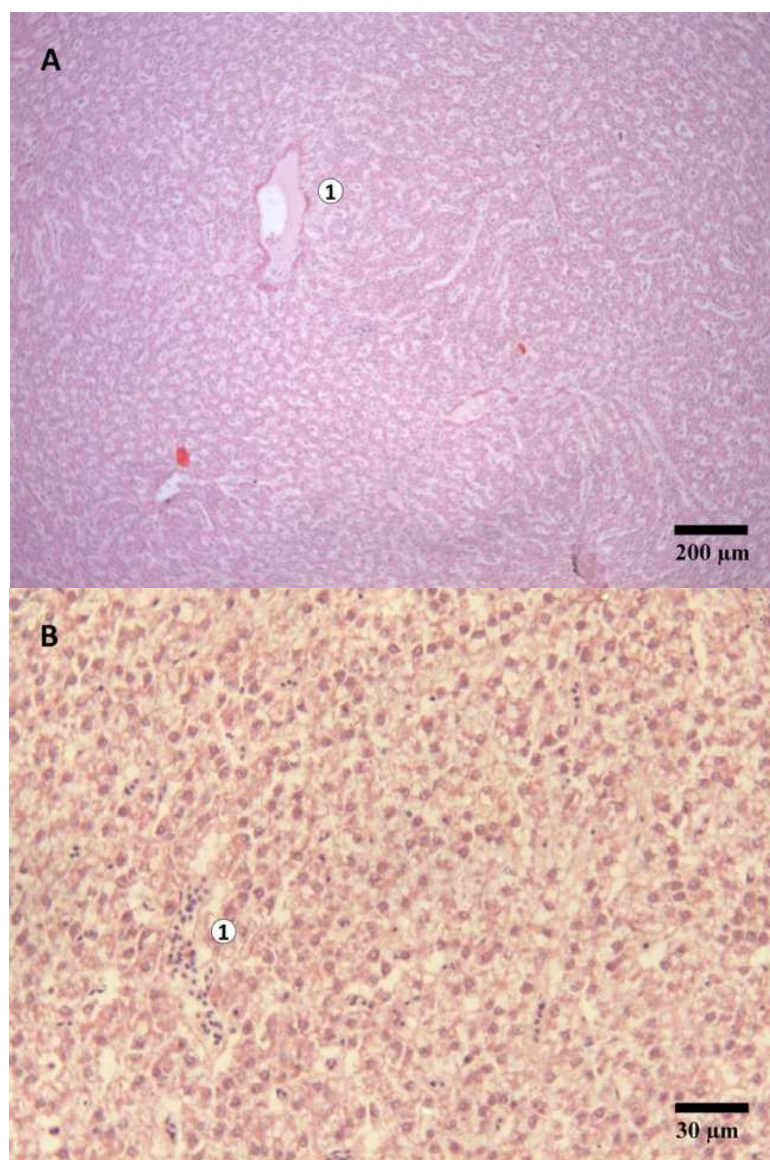


Figura 6- Observação de cortes histológicos do fígado de indivíduos *S.senegalensis* da amostragem do Mira. A – Observação do corte com ampliação de 100x. Parênquima hepático normal, constituído por células com citoplasma transparente, sem evidência de alterações do tecido hepático;1- veia hepática com estrutura bem definida, sem focos necróticos adjacentes. B- Observação do corte com ampliação de 400x; Fígado normal, sem patologias excepto alguma evidência de inflamação ligeira. Hepatócitos bem estruturados com forma poliédrica, núcleos com tamanho e forma praticamente constantes e bem definidos;1- Presença de glóbulos vermelhos no interior de sinusóides – evidência de ligeira inflamação do tecido hepático;

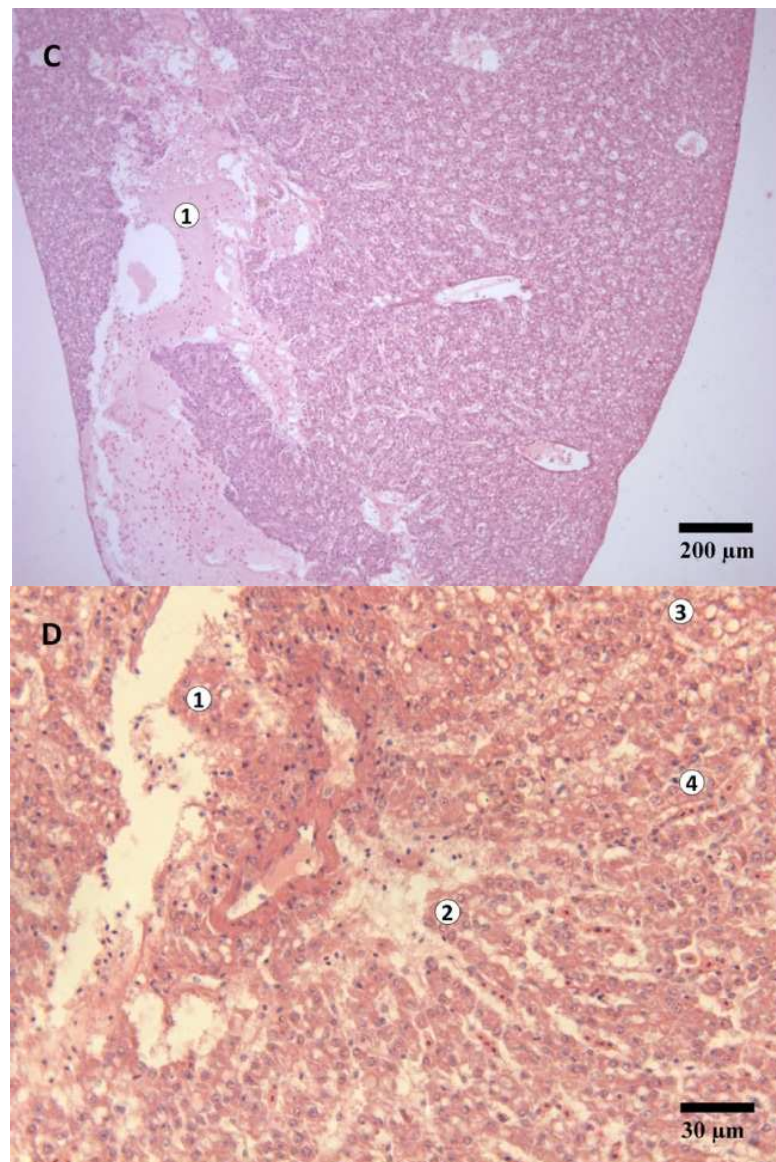


Figura 7 – Observação de cortes histológicos do fígado de indivíduos *S.senegalensis* da amostragem do Sado. C- Observação do corte com ampliação de 100x; Alterações nítidas do parênquima hepático, com evidência de danos nas células hepáticas. Potencial ruptura da veia hepática pela evolução do foco necrótico existente na sua envoltória. Evidência de inflamação ligeira ao longo do tecido hepático. Existência de lipidose moderada (cirrose lipídica); 1- Intrusão de RBCs (evidência de hemorragia) para o interior do tecido necrótico; D- Observação do corte com ampliação de 400x. Inclusão citoplasmática avermelhada associada a fortes danos do tecido hepático; 1- Potencial ruptura da veia hepática com vestígios de células hepáticas destruídas no seu interior. Alteração da forma poliédrica dos hepatócitos. Estrutura quase inexistente das paredes da veia hepática; 2- Foco de necrose difuso, evidência de estrutura danificada do parênquima hepático; 3- Evidência de lipidose pela presença de vacúolos no interior das células. 4- Presença de excesso de glóbulos vermelhos no interior de células sinusóides.

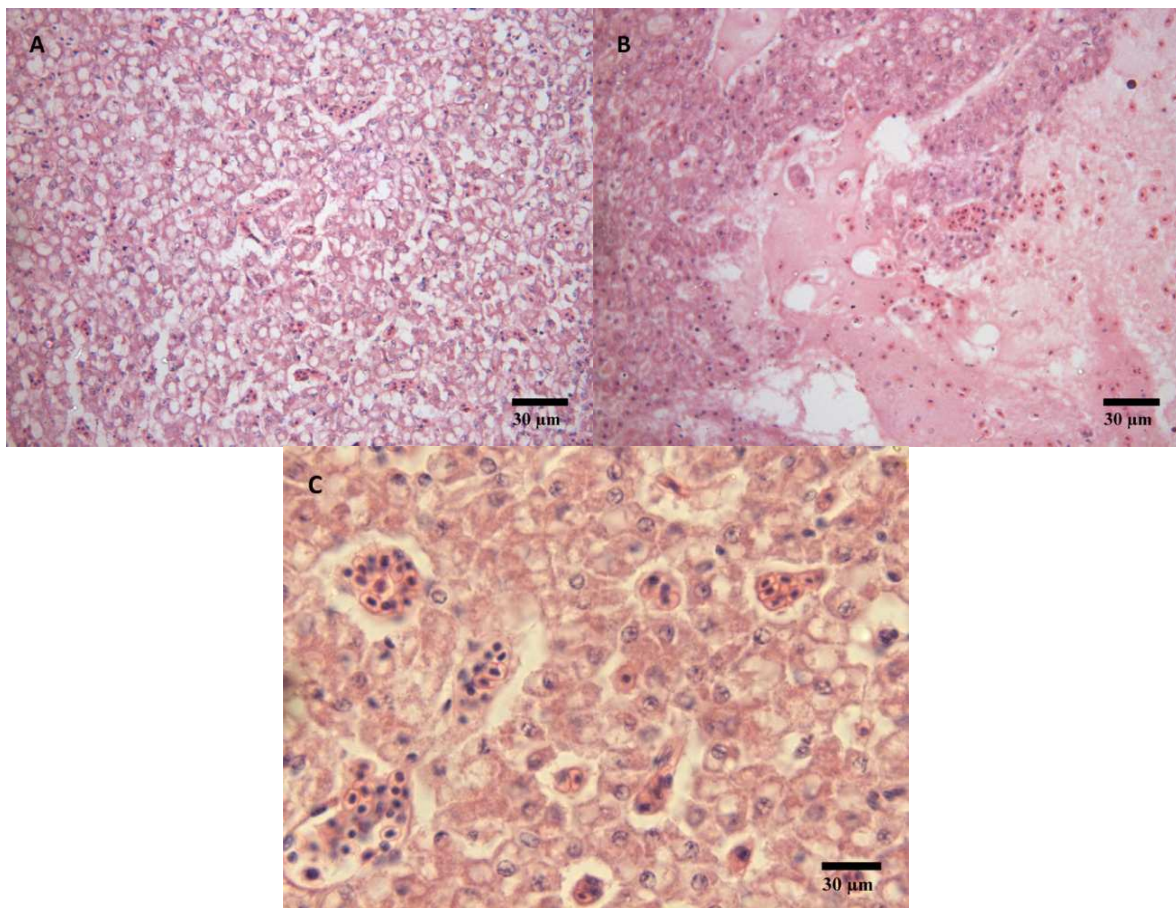


Figura 8 - Apresentação e identificação de vários tipos de biomarcadores presenciados em indivíduos amostrados no estuário do Sado. A - Observação do corte histológico com ampliação (400x); Parênquima hepático com grande presença de lipídose, presenciada pela proliferação de vacúolos no interior das células; B – Evidência de hemorragia identificada pela presença de um exsudado corado com hematoxilina e eosina e alteração da estrutura das células hepáticas, acompanhada da presença de focos necróticos difusos ao longo do tecido hepático. C - Observação de um corte com ampliação de 400x; Presença de sinusóides com estrutura dilatada e presença de glóbulos vermelhos no seu interior – evidência de inflamação do tecido hepático.

Tabela 7 - Observações histopatológicas e presença de biomarcadores em indivíduos *S. senegalensis*, das estações do Mira (SSM) e do Sado (SSS). A ocorrência de lesões é representada por (+) e a ausência por (-).

Indivíduos	Estuário	Biomarcador histopatológico			
		Inflamação	Necrose	Hemorragia	Lipidose
SSS01	Sado	++	++	-	++
SSS02		++	++	++	++
SSS03		++	++	-	++
SSM01	Mira	+	-	-	+
SSM02		+	+	-	+
SSM03		+	-	-	+

4.4 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada primeiramente através do teste paramétrico ANOVA. Perante a existência de diferenças nas variâncias entre as duas estações, não se verificou um dos pressupostos para aplicação de testes paramétricos (homogeneidade das variâncias). Por esta razão, optou-se pela utilização do teste U de Mann-Whitney (teste não paramétrico).

O teste U de Mann-Whitney (teste não-paramétrico) revelou não haver diferenças significativas, tanto relativamente ao nível de MT entre os indivíduos de cada estação individualmente, como relativamente ao comprimento standard dos mesmos, uma vez que os valores de p-level foram superiores a 0,05 (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores de p do teste U de Mann-Whitney

Teste U de Mann-Whitney	
	p-level
Cs	0,299
MT	0,570

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos nas correlações existentes entre as variáveis, a partir do teste de Spearman.

Tabela 9 - Valores das correlações realizadas pelo teste de Spearman, entre as variáveis Cs e MT, no Sado, no Mira e no total das duas estações.

Correlações pelo Teste de Spearman			
	Sado	Mira	Total
	MT		
Cs	0,345	0,4236	0,4236

Na estação do Mira, verificou-se a existência de correlação entre as variáveis Cs e MT. O mesmo não ocorreu na estação do Sado. Por fim, os valores totais correlacionados apresentaram uma correlação moderada entre o teor de MT e o comprimento dos indivíduos ($R = 0,4236$).

4.5 Análise dos sedimentos

4.5.1 Caracterização geral do sedimento

Os valores percentuais relativos às características físicas dos sedimentos estuarinos, matéria orgânica total (TOM) e Fracção Fina (FF) estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores percentuais de matéria orgânica total (TOM) e fracção fina (FF).

Estações	%TOM	%FF
S	0,9±0,1%	2,53%
M	7,9±0,3%	72,45%

A caracterização geral dos sedimentos obteve resultados divergentes entre as duas estações avaliadas. Os teores de matéria orgânica total (TOM) e FF (Fracção Fina) apresentados para o estuário do Mira, indicam características de sedimentos vasosos. Pelo contrário, a zona de amostragem do Sado, apresentou teores de FF e TOM mais baixos, que representam características de sedimentos arenosos.

4.5.2 Caracterização da contaminação metálica

De acordo com os dados de contaminação metálica apresentados na Tabela 16, do Anexo 1 e a observação da Figura 8, os sedimentos da amostragem do Sado apresentaram concentrações mínimas de metais e metalóide mais baixas que a zona de referência, sendo que nenhum dos valores ultrapassou o valor de TEL. As concentrações máximas do estuário do Sado apresentaram-se mais elevadas que os valores apresentados no estuário do Mira, destacando-se a concentração de

zinco, cobre e cádmio, por ordem decrescente, as quais ultrapassaram os níveis de PEL. Deste modo, existe uma maior probabilidade de ocorrência de efeitos adversos biológicos no estuário do Sado, uma vez que a maioria das concentrações dos contaminantes metálicos se apresenta ou acima do valor de PEL (zinco e cádmio) ou entre os valores PEL e TEL (arsénio, chumbo e cobre). Nos sedimentos da amostragem do Mira, foram evidenciadas maiores concentrações de arsénio e cobre que ultrapassaram o valor TEL. Nenhum dos contaminantes metálicos presentes na estação do Mira ultrapassou o valor PEL. O crómio foi o único contaminante que não apresentou risco de contaminação nas zonas de amostragem. Em geral, a concentração de todos os metais é mais elevada na estação do Sado.

A Figura 9 apresenta a concentração dos contaminantes metálicos presentes nas zonas de amostragem, em conjunto com os valores PEL e TEL, dando uma melhor percepção dos limites de contaminação e os potenciais efeitos biológicos adversos.

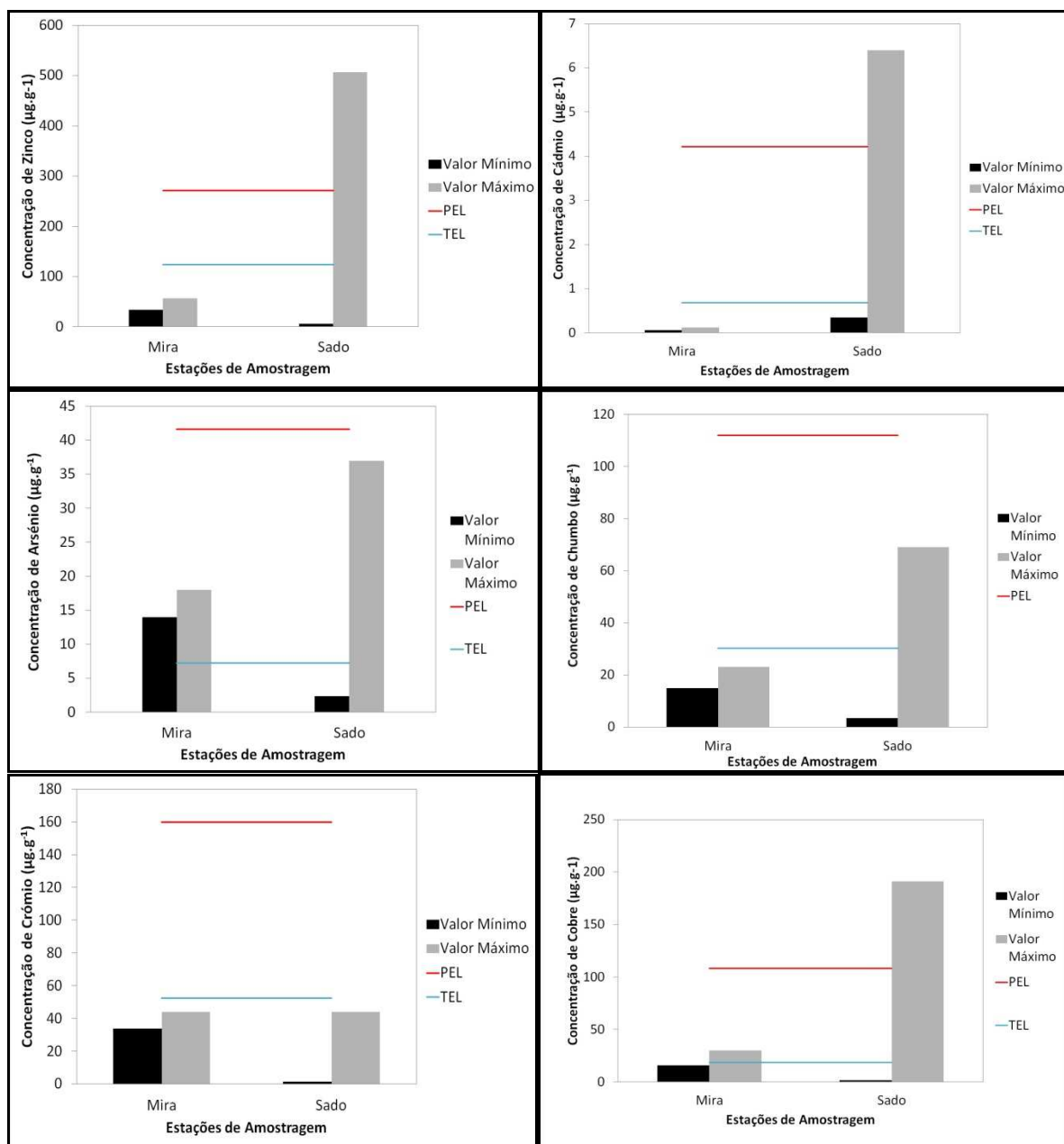


Figura 9 - Concentrações mínimas e máximas de contaminantes metálicos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso seco sedimento) nas estações de amostragem (Mira e Sado) e respectivos valores PEL e TEL dos metais zinco, cádmio, crómio, chumbo, cobre e, metalóide arsénio.

Na Figura 10 estão representados os valores mínimos e máximos das concentrações de contaminantes metálicos nas duas estações de amostragem. Em geral, o estuário do Sado registou uma maior amplitude de concentrações metálicas,

sendo os seus teores mínimos mais reduzidos e em simultâneo os teores máximos mais elevados.

No estuário do Mira (zona de referência) é possível observar que os valores máximos e mínimos não variam muito entre si.

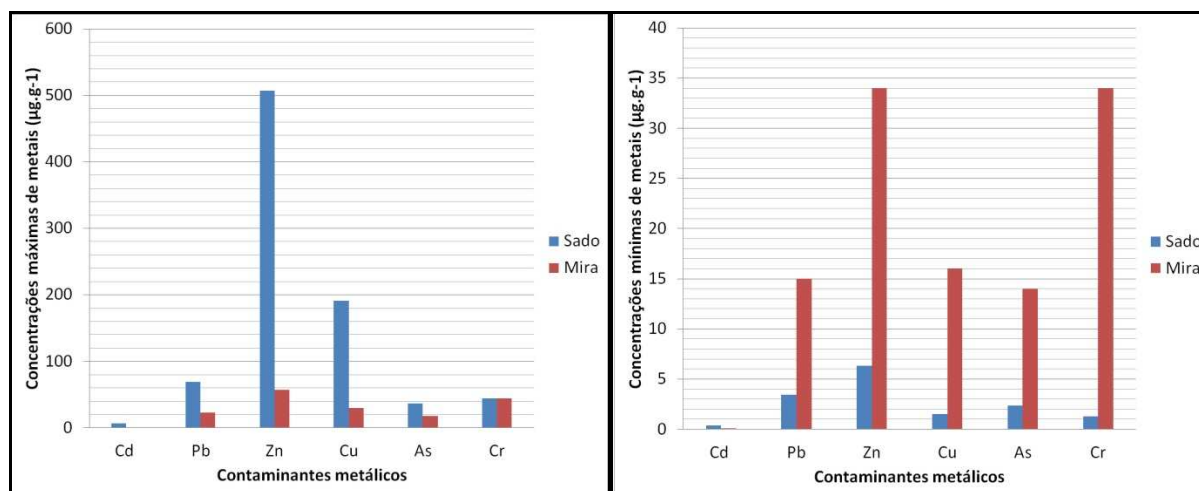


Figura 10 - Concentrações máximas e mínimas de metais na zona de amostragem do Sado e zona de referência do Mira.

Os resultados do índice de qualidade sedimentar (SQG-Q) obtidos através do cálculo das equações [1] e [2] referidas no capítulo 2, são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- Valores de SQG-Q relativos às duas estações de amostragem.

Estação	Valor	SQG-Q
Sado	Mínimo	0,04
	Máximo	1,08
Mira	Mínimo	0,162
	Máximo	0,238

Os valores de SQG-Q indicam o potencial risco ecológico dos sedimentos. Os valores de SQG-Q mínimos e máximos apresentaram uma maior discrepância no estuário do Sado, sendo o valor máximo bastante mais elevado que no estuário do Mira e com nível de impacte elevado. Em contrapartida, o valor mínimo não apresenta quaisquer potenciais de efeitos adversos biológicos. Os valores de SQG-Q da estação do Mira encontram-se dentro do intervalo de valores de nível moderado de impacte, embora não representem valores muito elevados. Em termos gerais, o valor de SQG-Q para o estuário do Mira é representativo de uma maior qualidade, de acordo com MacDonald *et al.* (2004).

5. Discussão

As lesões hepáticas evidentes em linguados têm sido classificadas como bons indicadores de exposição a contaminantes (Myers, Rhodes, e McCain, 1987; Metcalf, Cairns e Fitzsimons, 1988; Vethaak *et al.*, 1996 e G.D. Stentiford, 2004), sendo a sua extensão e gravidade proporcionais ao tempo de exposição dos indivíduos envolvidas neste tipo de intoxicação. Por este motivo, é possível considerar o maior número de alterações histopatológicas evidenciados no fígado de linguados da espécie *S. senegalensis*, na zona de amostragem do Sado, como indicativo de maior contaminação metálica e de divergências nas características físico-químicas comparativamente com a zona de referência. Na zona de amostragem do Sado, a maioria dos indivíduos apresentou cirrose lipídica e alguns focos de necrose ao longo do tecido hepático. Segundo alguns autores, a presença de vacúolos é um mecanismo de resposta para armazenar xenobióticos lipossolúveis (como PAHs e organoclorados) ou os metabolitos associados (Köhler, 1990; Biagianti-Risbourg *et al.*, 1995; Arellano *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 2006; Giari *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2008), ou ainda resposta a misturas de contaminantes (Ribeiro *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2009b; Greenfield *et al.*, 2008 e Triebkorn *et al.*, 2008). A lipidose hepática tem sido ainda observada em peixes expostos a metais (Moore *et al.*, 1997; Simpson *et al.*, 2000; Stehr *et al.*, 1998; Vethaak *et al.*, 1996; Arellano *et al.*, 1999; Giari *et al.*, 2007; Shaw *et al.*, 2006; Roberts e Oris, 2004 e Ribeiro *et al.*, 2005).

Em conjunto com a presença de exsudado no plasma, a evidência de muitos sinusóides no parênquima hepático indicou a existência de várias inflamações ao longo do tecido, assim como a presença excessiva de glóbulos vermelhos no interior destas células, provavelmente devido ao aumento da actividade hepática na

produção de proteínas aquando a presença de substâncias xenobióticas. A presença de coloração de hematoxilina e eosina no interior dos hepatócitos manifesta a evolução do órgão relativamente à sua maturidade, e significa uma redução de armazenamento de glicogénio, ao contrário do que acontece em fígados de peixes juvenis que apresentam transparência nos hepatócitos (Simpson, 1992; Costa *et al.* 2009d). De acordo com estudos anteriormente realizados, foi verificado que as variações de armazenamento de glicogénio nos animais, podem ser influenciadas pelas condições fisiológicas (idade, sexo), bem como pelas condições nutricionais e térmicas a que estão sujeitos (Ferguson, 1989; Biagianti-Risbourg, 1991; Costa *et al.*, 2009c).

O fígado é um órgão com funções importantes no organismo dos peixes, responsável pela limpeza de substâncias poluentes presentes no sangue e que provém do intestino, no entanto é especialmente susceptível à acção de produtos químicos, devido ao baixo fluxo sanguíneo em relação ao débito cardíaco, tornando mais vagarosa a depuração de produtos tóxicos (Gingerich, 1982). Este órgão tende a concentrar metais no seu interior e exibir um potencial relativamente elevado de bioacumulação e desintoxicação (Roesijadi e Robinson, 1994).

A presença de vacúolos lipídicos (lipidose) é bastante comum em peixes teleósteos e pode ter duas origens: evidências devidas à dieta fornecida em peixes de aquacultura, ou devido à privação de alimentos no caso de peixes residentes no estuário, provocando stress oxidativo e aumento da peroxidação lipídica no organismo (Viarengo *et al.*, 1999; Vendemiale *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2004). Existem, no entanto, resultados contraditórios relativamente ao verdadeiro impacte biológico desta condição. De acordo com Tucker *et al.* (1997), por exemplo, não

resultam efeitos adversos da existência de lipidose em peixes de aquacultura. No entanto, outros autores discutem que a lipidose pode alterar o metabolismo dos animais tornando-os mais susceptíveis à aquisição de disfunções hepatocelulares (Sánchez-Pérez *et al.*, 2005), o que está de acordo com as observações de Costa *et al.* (2009), associando esta condição à presença de alterações hepatocelulares de carácter pré-neoplásico em *S. senegalensis* expostos a sedimentos contaminados originários do estuário do Sado. É de notar, no entanto, que não foi possível determinar, no presente estudo, os conteúdos estomacais dos linguados analisados em qualquer das estações, desta forma impossibilitando a associação desta patologia a disfunções alimentares.

Estudos prévios divulgaram a existência de uma correlação significativa entre o fígado de *S. senegalensis* e a presença de cobre nos sedimentos, originando alterações patológicas (Baker, 1969; Gardner *et al.*, 1973; Bunton *et al.*, 1989, Buckley *et al.*, 1982). Em estudos prévios, a presença de cobre nos organismos demonstrou ainda a diminuição da quantidade de glicogénio dentro das células hepáticas, bem como a existência de múltiplos focos de inflamação (Schwaiger *et al.*, 1997). No entanto, Costa *et al.* (2009c) observaram que a presença da desorganização hepatocelular difusa em *S. senegalensis* pode ocorrer como consequência da exposição a misturas complexas de contaminantes, nomeadamente associadas a sedimentos estuarinos.

A presença de necrose hepatocelular está relacionada com a exposição de peixes a contaminantes advindos das actividades antropogénicas (Wyllie *et al.*, 1980; Meyers *et al.*, 1985; Pitot *et al.*, 1988), nomeadamente devido à presença de cobre que provoca também estagnação do sangue, expansão de capilares e vacuolização do

tecido hepático (Costa *et. al.*, 2009d e Arellano *et. al.*, 1999). O excesso de contaminação por este metal pode provocar a síntese de MTs no fígado como processo de desintoxicação (Bremmer, 1991).

Relativamente à análise de sedimentos, o presente estudo demonstrou que diferentes perfis de contaminação do sedimento estuarino causam padrões distintos de lesões histológicas em *S. senegalensis* juvenis. Sedimentos contaminados com metais, induzem genotoxicidade de forma significativa no corpo dos organismos (Caeiro, 2004). Os sedimentos contaminados têm elevada relevância em estudos de avaliação da contaminação de espécies estuarinas, por agirem como componentes integradoras em processos de misturas complexas e como amplificadores de efeitos adversos biológicos provenientes da presença de contaminantes (DelValls *et. al.*, 1999), com origem em efluentes de actividades antropogénicas. Por este motivo, os sedimentos têm sido amplamente estudados, com o objectivo de identificar as fontes poluentes, medir a sua extensão e diagnosticar a qualidade ambiental dos sistemas aquáticos (Luoma, 1990). A maioria dos contaminantes que atinge a zona costeira tende a ser adsorvida pela matéria particulada ou a decantar no fundo do estuário, onde pode permanecer durante longos períodos de tempo, e por esse motivo afectar a comunidade bentónica que reside no sedimento. Através da avaliação do grau de contaminação dos sedimentos do local de interesse é possível obter-se informação sobre o grau de afectação que sofrem os organismos (Nipper, 2000).

Em geral, a concentração metálica apresentou-se mais elevada na zona de amostragem do Sado. A concentração máxima dos metais, na amostragem do Sado, evidenciou maior risco quanto ao zinco, cádmio e cobre, uma vez que a concentração determinada destes metais ultrapassou o valor PEL, o que indica que

existe um elevado potencial na ocorrência de efeitos adversos biológicos no *biota* associado aos sedimentos contaminados. É sugerido por Costa *et. al.*, (2009c) que estes metais tenham atingido o estuário devido à influência do Canal Norte, zona com elevada pressão de actividades humanas, que podem ser responsáveis pela introdução de muitos contaminantes metálicos; a contaminação de cobre e eventualmente zinco terá origem provavelmente nas actividades mineiras; e a existência de baixa hidrodinâmica em certas zonas do estuário provoca a deposição e retenção dos contaminantes a nível sedimentar, através do estabelecimento de fortes ligações entre estes dois elementos. Efluentes das indústrias Lisnave e Eurominas, em conjunto com as correntes residuais do Canal de Águas de Moura, produzem um efluente rico em poluentes metálicos e orgânicos, nomeadamente cádmio, cobre, zinco, arsénio e TBTs. Adicionalmente, as explorações agrícolas dos campos circundantes serão responsáveis pela presença de pesticidas como o DDT, entre outros.

As concentrações de chumbo e de arsénio apresentaram-se entre os valores PEL e TEL, sendo que existe um risco moderado na ocorrência de efeitos biológicos adversos. As concentrações máximas mais elevadas foram obtidas no estuário do Sado, embora as concentrações mínimas tenham sido mais baixas que as observadas no estuário de referência.

A diferença entre concentrações mínimas e máximas do estuário do Sado são devidas à sua topografia, à elevada heterogeneidade espacial, devido às descontinuidades sedimentares e à forte hidrodinâmica que determinam a circulação estuarina, dispersando os contaminantes que se concentram em locais em que as

correntes são mais fracas, e determinando a diversidade de habitats (MacArthur, 1972; Emery 1978).

A baixa divergência entre as concentrações mínimas e máximas do estuário de referência é explicada pela baixa hidrodinâmica do estuário do Mira que pouco promove a dispersão dos contaminantes ao longo do estuário, devido à baixa velocidade das correntes (Andrade, 1986). Nos sedimentos da amostragem do Mira, foram evidenciadas maiores concentrações de arsénio e cobre que ultrapassaram o valor TEL. Nenhum dos contaminantes metálicos presentes na estação do Mira ultrapassou o valor PEL. A presença de arsénio em concentrações mais elevadas no estuário do Mira, poderá ter como origem a natureza das rochas da bacia hidrográfica e das margens do próprio estuário (Carlos Vale, com. pessoal). A acumulação de cádmio nos tecidos do fígado dos peixes é um processo rápido (Shariati *et. al.*, 2010) e este motivo em conjunto com os dados da concentração deste metal apresentado no estuário do Sado é a possível explicação para a existência de alterações histopatológicas mais acentuadas no fígado dos indivíduos da amostragem do Sado. Os contaminantes metálicos tendem a persistir no estuário por tempo considerável, tanto no organismo dos animais, como no material sedimentar (Nowell *et. al.*, 1999). Estes contaminantes tendem também a estar associados a processos de bioamplificação e contaminação de alimentos de organismos de topo, nomeadamente do Homem (Freanch, 1997). Para além das descargas directas, a contaminação do estuário pode também ter origem nos processos de dragagem que provocam a ressuspensão de sedimentos contaminados e podem contaminar zonas limpas após a redeposição (Pereira, 1996). A biodisponibilidade de contaminantes dos sedimentos é provavelmente reforçada pela desagregação e ressuspensão dos sedimentos aquando da sua

recolha. Com a movimentação dos sedimentos, os metais libertam-se das ligações estabelecidas com as argilas ou matéria orgânica e ficam disponíveis para absorção pelos animais que estejam em contacto com a água (Costa *et. al.*, 2009b). É notório que a elevada toxicidade metálica, como o caso do Cd, pode estar associada a uma disponibilidade prolongada na coluna de água, depois da ressuspensão dos sedimentos. O baixo potencial redox combinado com a ressuspensão de sedimentos, pode favorecer a libertação de contaminantes metálicos e, portanto, contribuir para o aumento da toxicidade dos sedimentos, favorecendo a biodisponibilidade de contaminantes e gerar efeitos negativos mais fortes nos organismos (Caetano *et. al.*, 2003; Eggleton *et. al.*, 2004 e Caeiro, 2004).

As características físico-químicas dos sedimentos são outro factor importante no aumento da toxicidade, devido à grande afinidade dos metais para com TOM e FF (Caeiro, 2004 e Caccia *et. al.* 2003). Desta forma, sedimentos mais vasosos, favorecem o processo de absorção de metais pelos peixes e a resposta de MTs aumenta (Costa *et. al.*, 2008a). Atkinson *et. al.*, (2007) demonstraram que a mistura física e bioturbação podem ser os elementos principais no aumento da disponibilidade de metais, mais do que as alterações de pH e de salinidade, podendo ainda ser responsáveis pela continuação da elevada biodisponibilidade.

Dependendo da concentração dos contaminantes e do tempo de exposição dos animais a estes elementos, os efeitos dos contaminantes podem ser considerados mais ou menos graves. Quando são elevadas, as concentrações de poluentes podem induzir mecanismos de adaptação nos peixes, e deste modo influenciar a tendência esperada dos resultados de contaminação do local. Para além disso, no caso do organismo estar exposto a elevadas concentrações de contaminantes por

um tempo de exposição alargado, pode sofrer danos irreversíveis na funcionalidade e morfologia das células e, deste modo, perder a capacidade de reagir, determinando por exemplo a redução da indução de MTs.

Diversos trabalhos têm demonstrado que a mistura de contaminantes nos sedimentos pode provocar efeitos antagónicos em peixes bentónicos jovens. Por exemplo a presença de contaminantes metálicos em conjunto com PAHs pode reduzir a toxicidade dos contaminantes orgânicos, causando o atraso do desenvolvimento e dos danos histopatológicos nos indivíduos expostos a sedimentos com esta mistura de contaminantes (Bruschweiler *et al.*, 1996; Vakharia *et al.*, 2001; Spink *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2009b). Apesar do crómio induzir a síntese de MT no fígado de peixes, quando exposto individualmente (Roberts e Oris 2004) é conhecido por ter um efeito contrário na indução de MT, na presença de metais como o Cádmio e o Zinco (Majumder *et al.*, 2003). De acordo com Collier *et al.* (1998) existe uma forte relação entre os contaminantes presentes nos sedimentos e a existência de alterações histopatológicas no fígado, sendo a quantidade de substâncias xenobióticas presentes no órgão dos peixes, directamente proporcional ao grau de poluição por metais pesados e pesticidas. Os ensaios elaborados em laboratório contribuem para a avaliação destas anomalias e a veracidade destes resultados foi demonstrada por estudos efectuados por Vethaak *et al.* (1996) e Hatch *et al.* (1999). Estudos prévios com *S. senegalensis* expostos a sedimentos contaminados recolhidos em locais próximos da zona de amostragem, relataram uma correlação entre as alterações hepatocelulares e a contaminação de sedimentos (Costa *et al.*, 2009b).

No caso do presente estudo, o facto de não existir grande diferença entre os valores de MT nas zonas de amostragem pode ter sido devido a vários factores: i) a diferença de quantidade de amostras recolhidas nas duas estações, que estatisticamente eleva o erro de comparação entre as duas estações e não reflecte resultados representativos (21 indivíduos na amostragem do Sado e 4 indivíduos na amostragem do Mira); ii) a mistura de contaminantes presentes no estuário do Sado e os possíveis efeitos antagónicos, explicados anteriormente e ainda iii) a degradação morfológica e funcional dos organismos em elevada exposição a contaminantes.

Alguns autores têm argumentado que é necessária precaução na interpretação de resultados quando se considera como biomarcador de contaminação a indução de MT por metais, na biomonitorização de sedimentos (Mouneyrac *et. al.*, 2002), mas de acordo com Jimenez-Tenório *et. al.* (2007), a indução de MT no fígado de *S.senegalensis* relaciona-se perfeitamente com os metais presentes em sedimentos, principalmente Cd e Zn.

Os valores guia de qualidade sedimentar (Sediment Quality Guideline Quotients (SQG-Q) (Long and MacDonald, 1998) foram calculados para cada metal utilizando o nível de efeito provável (PEL) para cada contaminante (Macdonald *et. al.*, 1996). A classificação dos sedimentos de acordo com potenciais efeitos adversos foi aplicada de acordo com MacDonald *et. al.*(2000). A comparação entre as concentrações de contaminantes dos sedimentos analisados e os valores SQG para as zonas costeiras (MacDonald *et. al.*, 1996), nomeadamente o nível limite de ocorrência de efeitos biológicos adversos (TEL) e o nível de ocorrência provável de efeitos

biológicos adversos (PEL), sugerem que os sedimentos do estuário do Sado sejam os responsáveis pela toxicidade mais elevada.

No entanto, a contaminação global dos sedimentos testados pode ser considerada moderada, já que os valores limiares de PEL são alcançados somente para Cu, Zn e Cd. A gravidade das lesões observadas nos indivíduos amostrados no estuário do Sado pode ser explicada por três factores: (1) a maior concentração de metais nos sedimentos do estuário do Sado e provavelmente alguns compostos orgânicos presentes, especialmente alguns PAH e PCB; (2) efeitos sinérgicos (e não cumulativos) de metais, que podem ter causado diminuição ou atraso nas respostas dos peixes à toxicidade presente, (3) a maior libertação de contaminantes através de dragagens dos sedimentos de um local para outro (o remexer dos sedimentos), aumentando a biodisponibilidade de tóxicos (Costa *et. al.*, 2009d) e ainda (4) uma vez que a área de amostragem neste estuário se caracteriza por sedimentos com reduzida fracção fina e matéria orgânica, os contaminantes poderão estar localmente mais disponíveis para os organismos bentónicos presentes.

Pelo contrário, os sedimentos do Mira, na área de amostragem, revelaram teores mais elevados de matéria orgânica e finos, condições que determinam uma menor biodisponibilidade dos contaminantes, já de si presentes com concentrações baixas, e uma maior coesão dos sedimentos, portanto menor ressuspensão.

6. Conclusão e Perspectivas futuras

O estudo realizado revelou que o estuário do Sado apresenta uma maior contaminação comparativamente com o estuário do Mira, em relação à presença de metais, o que está de acordo com os elevados efeitos dos biomarcadores histopatológicos observados. Os teores de MT são relativamente semelhantes nas duas estações e, como anteriormente explicado, este facto, no estuário do Sado, pode dever-se a uma adaptação dos organismos aos níveis de exposição de contaminantes.

Em aplicações futuras, seria interessante realizar-se uma avaliação de risco ambiental e da saúde humana, tendo em conta os diversos processos de bioacumulação e bioampliação de diversos contaminantes, que uma vez inseridos nas cadeias tróficas, afectam os níveis superiores das cadeias alimentares, e consequentemente o ser humano, tornando-se um risco para a saúde pública. Para tal, seria necessário avaliar-se e quantificar-se a presença de contaminantes metálicos no interior dos organismos, bem como proceder à avaliação de contaminantes orgânicos presentes no estuário, de igual forma à realizada na avaliação da contaminação metálica.

7. Referências bibliográficas

Adão, M. (2003). *Dinâmica das comunidades de meiofauna em sedimentos associados aos povoamentos de *Zosteranoltii* no estuário do Rio Mira*. Dissertação de Doutoramento. Universidade de Évora, Évora, Portugal.

Andrade, F. (1986). *O estuário do Mira: caracterização geral e análise quantitativa da estrutura dos povoamentos bentónicos*. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal. 393 pp.

Araújo, I. A. (1987). *O essencial sobre o litoral português*. Imprensa Nacional- Casa da Moeda.

Arellano, J. M., Storch, V., Sarasquete, C. (1999). *Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegalese sole, *Solea senegalensis**. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 44, 62–72.

Atkinson, C.A., Jolley, D.F., Simpson, S.L. (2007). *Effect of overlying water pH, dissolved oxygen, salinity and sediment disturbances on metal release and sequestration from metal contaminated marine sediments*. *Chemosphere* 69, 1428–1437.

Au, D., (2004). *The application of histo-cytopathological biomarkers in marine Monitoring: A review*. *Mar. Pollut. Bull.*, 48: 817-834.

Baker, J. T. (1969). *Histological and electron microscopical observations on copper poison in gin the winter flounder (Pseudo-pluronectes americanus)*. J Fish Res Bd Can 1969;26: 2785–93.

Bebianno, M.J., Langston, W.J. (1999). *Metallothionein induction in mussels exposed to a metal mixture*. In: Klaassen, C. (Ed.), *Metallothionein IV*. Birkhauser Verlag, Basel, pp. 187–194.

Biagianti-Risbourg, S., Pairault, C., Vernet, G., Boulekbache, H., (1995). *Effect of lindane on the ultrastructure of the liver of the rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, sac-fry*. Chemosphere 33, 2065–2079.

Boldina-Cosqueric, I., Amiard, J., Amiard-Triquet, C., Dedourge-Geffard, O., Métais, I., Mouneyrac, C., Moutel, B., Berthet, B. (2010). *Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve Scrobiculariaplana as tools for the assessment of estuarine sediment quality*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 1733-1741.

Bordin, G., McCourt, J., Cordeiro Raposo, F., Rodriguez, A.R., (1997). *Metallothionein-like metalloproteins in the baltic clam Macomabalthica: seasonal variations and induction upon metal exposure*. Mar. Biol. 129, 453–463.

Branco, M. A., (2004). *Estudo da Produção de linguado (Solea senegalensis Kaup, 1858). em tanques de terra*. Dissertação para acesso à categoria de Investigador Auxiliar. Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (IPIMAR). 180 p.

Bremner I., (1991). *Metallothionein and copper metabolism*. Methods Enzymol 1991;205B:584–91.

Brett, J.R. (1958). *Implications of assessment of environmental stress*. In: Larkin, P.A. (ed.) *The investigation of fish-power problems*. H.R. MacMillan Lectures in Fisheries, University of British Columbia, Vancouver, Canada, pp 69-83.

Bruschweiler ,B.J., Wurgler, F.E., Fent, K. (1996). *Inhibitory effects of heavy metals on cytochrome P4501A induction in permanent fish hepatoma cells*. Arch Environ Con Tox 31:475-482

Bucheli, T.D., Fent, K. (1995). *Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems*. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 25, 201 268.

Buckley, J.T.;Roch, M., McCarter, J.A., Rendell, C.A., Matheson, A.T. (1982). *Chronic exposure of coho salmon to sublethal concentrations of copper, and on copper tolerance*. Comp BiochemPhysiol C 1982;72:15–9.

Bunton, T. E. Fraizier, J. M., (1989). *Hepatocellularultrastructurein white perch (Moroneamericana) withabnormalhepatic Koper storage*. MarEnvironRes1989; 28:375–82.

Cabeçadas, G., Brogueira, M. J. (1993). *The behaviour of phosphorus in the Sado estuary, Portugal*. Environmental Pollution, ICEP.2 345-352.

Cabral, H. N.,(2000). *Distribution and abundance pattern of flat fishes in the Sado estuary, Portugal*. Estuaries, Vol.23, 3: 351-358

Cabral, H., Costa, M. J., (1999). *Differential use of nursery areas within the Tagus estuary by sympatric soles, Solea solea and Solea senegalensis*. Environmental Biology of Fishes 56: 389-397.

Caccia VG, Sillero, FJ., Palanques, A. (2003). *The distribution of trace metals in Florida Bay sediment*. Mar Pollut Bull 46:1420-1433

Caeiro S., Costa MH., Ramos TB., Fernandes F., Silveira N., Coimbra A., Medeiros G., Painho M. (2005). *Assessing heavy metal contamination in Sado Estuary sediment: An index analysis approach*. Ecological Indicators 5. 151–169.

Caeiro, S., Goovaerts, P., Painho, M., Costa, M. H., (2003). *Delineation of estuarine management areas using multivariate geostatistics: the case of Sado Estuary*. Environ. Sci Technol. 37,4052–4059.

Caeiro, S. (2004). *Environmental data management in the Sado estuary: weight of evidence to assess sediment quality*. Dissertação PhD. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.414 p.

Caeiro, S., Costa, M. H., DelValls, A., Repolho, T., Gonçalves, M., Mosca, A., Coimbra, A. P., Ramos, T. B., Painho, M. (2009). *Ecological risk assessment of sediment management areas: application to Sado Estuary, Portugal*. Ecotoxicology 18: 1165-1175.

Caetano, M., Madureira, M.J., Vale, C. (2003). *Metal contaminated remobilisation during resuspension of anoxic contaminated sediment: short-term laboratory study*. Water Air Soil. Pollut. 143, 23–40.

Caetano, M., Fonseca, N., Cesário, R., Vale, C., (2007). *Mobility of Pb in salt marshes recorded by total content and stable isotopic signature*. Sci. Total Environ. 380, 84–92.

Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., (2000). *The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach*. Sci. Total Environ. 247, 295–311.

Cameron, W. M., Pritchard, D. W. (1963). *Estuaries*. In: Hill, M.N. (Ed.), *The Sea*, vol. 2. Wiley, New York, pp. 306- 324.

Canesi, L; Viarengo, A; leonzio, C; Filippelli, M.; Gallo, G (1999). *Heavy metals and glutathione metabolism in mussel*. Aquatic Toxicol. 46:67-76

Carvalho, G. S., Gomes, V. F., Pinto, F. T., (2000). *Os estuários de Portugal e os planos de bacia hidrográfica*. Associação EUROCOAST-PORTUGAL (Ed.):35-43. Universidade de Coimbra.

Chapman PM, Fairbrother A, Brown D (1998). *A critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment*. Environ Toxicol Chem 17:99-108.

Coutinho, M. T. (2003). *Comunidade fitoplanctónica do estuário do Sado. Estrutura, Dinâmica e Aspectos Ecológicos*. Dissertação para Investigador Auxiliar. Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas (IPIMAR). 328 p.

Costa, M., Zhuang, Z., Huang, X., Cosentino, S., Klein, C.B., Salnikow, K. (1994a). *Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis*. Sci. Total Environ. 148, 191–199.

Costa, M. J., Costa, J. L., Almeida, P. R. e Assis, C. A. (1994b). *Do eel grass beds and salt marsh borders act as preferential nurseries and spawning grounds for fish? An example of the Mira estuary in Portugal*. Ecological Engineering, 3: 187-195.

Costa, P. M., Repolho, T., Caeiro S., Diniz, M. E., Moura, I., Costa, M. H., (2008a). *Modelling metallothionein induction in the liver of Sparus aurata exposed to metal-contaminated estuarine sediments*. Ecotox Environ Saf 71. 117-124.

Costa, P.M., Caeiro, S., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Vale, C., Dell Valls, T. A., Costa, M.H. (2008b). *Genotoxic damage in Solea senegalensis exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): effects of metallic and organic contaminants*. Mutat. Res. 654, 29-27.

Costa P. M., Santos, H. M., Peres, I., Costa, M. H, Alves, S. Capelo-Martinez, J. L, Diniz M. S. (2009a). *Toxicokinetics of Waterborne Trivalent Arsenic in the Freshwater Bivalve Corbicula fluminea*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 57. 338–347.

Costa, P., Caeiro, S., Diniz, M., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A., Caetano, M., Vale, C., DelValls, A., Costa, M., (2009b). *A description of chloride cell and kidney tubule*

alterations in the flatfish Solea senegalensis exposed to moderately contaminated sediments from the Sado estuary (Portugal). Journal of Sea Research 64: 465-472.

Costa, P. M., Diniz, M. S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T. A., Costa, M. H., (2009c). *Histological biomarkers in liver and gills of juvenile Solea senegalensis exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach.* Aquatic Toxicology 92: 202-212.

Costa, P. M., Caeiro, S., Diniz, M. S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T. A., Costa, M. H. (2009d). *Biochemical endpoints on juvenile Solea senegalensis exposed to estuarine sediments: the effect of contaminant mixtures on metallothionein and CYP1A induction.* Ecotoxicology 18: 988-1000.

Costa, P.M., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., DelValls T. A., Costa, M. H., (2010). *Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and in situ tested fish.* Marine Pollution Bulletin.

DelValls, T.A., Blasco, J., Sarasquete, M.C., Forja, J.M., Gomez-Parra, A., (1998). *Evaluation of heavy metal sediment toxicity in littoral ecosystems using juveniles of the fish Sparus aurata.* Ecotoxicol. Environ. Safe. 41, 157–167.

Di Toro, D.M., Zarba, C.S., Hansen, D.J., Berry, W.J., Swartz, R.C., Cowan, C.E., Pavlou, S.P., Allen, H.E., Thomas, N.A. and Paquin, ER. (1991) *Technical basis for establishing sediment quality criteria for non-ionic organic chemicals using equilibrium partitioning.* Environ. Toxicol. Chem. 10, 1541-83.

Díaz, M., Blasco, J., Sales, D., DelValls, T., (2004). *Biomarkers as tools to assesssediment quality*. Laboratory and field surveys. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 23, No. 10-11.

Dinis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C., (1999). *A review on the cultivation potential of Solea senegalensis in Spain and in Portugal*. Aquaculture 176, 27–38.

Diniz, M., Santo, HM., Costa, PM, Peres, I, Costa MH, Capelo, JL (2007). *Metallothionein responses in the Asiatic clam (Corbicula flumínea) after exposure to trivalente arsenic*. Biomarkers 12:589-598.

Eggleton, J., Thomas, K.V., 2004. *A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events*. Environ. Int. 30, 973–980.

Eisler, R E, Gadner, G. R., (1973). *Acute toxicology to an estuarine teleost of mixtures of cadmium, copper and zinc salts*. J Fish Biol 1973;5:131–42.

Emery, A. R. (1978). *The basis of fish community structure: Marina and freshwater comparisons*. Environmental Biology of fishes 3:33-47.

EC (European Commission) (2001). *Opinion of the Scientific Committee on veterinary measures relating to public health on Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus (in raw and undercooked seafood)*. Health and Consumer Protection Directorate General. 64 p.

Ferguson, H.W. (1989). *Systematic Pathology of fish. A text and Atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts*. Iowa State University Press. USA. 263p.

Ferreira, J.G., Nobre, A. M., Simas, T. C., Silva, M. C., Newton, A., Bricker, S.B., Wolff, W.J., Stacey, P.E., Sequeira, A., (2005). *A methodology for defining homogeneous water bodies in estuaries e Application to the transitional systems of the EU Water Framework Directive*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 66: 468-482.

Ferreira, J. G., Sintra, T., Nobre, A., Silva, M.C., Shifferegger, K., Lencart-Silva, J. *Identification of sensitive áreas and vulnerables zones in transitional and coastal portuguese systems*. Instituto da Água (INAG) e Instituto do Mar (IMAR).

Huss, H.H., Ababoush, L., Gram, L. (2004). *Assessment and management of seafood safety and quality*. FAO Fisheries technical paper 444. ISSN 0429-9345

FAO (Food and Agriculture Organization) (2000). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. FAO, Roma, Itália.

FDA (Food and Drug Administration) (1997). *Food Code*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, FDA, Washington DC, USA.

Fitch, K.L., Johnson P.B (1977). *Human life science*. Holt, Rinehart and Winston. Nova Iorque.

García, J. G., García, B. G. (2006). *Na econometric viability model for ongrowing sole (Solea senegalensis) in tanks using pumped well sea water*. Spanish Journal of Agricultural Research 4: 304-315.

George, S.G., Groman, D., Brown, S., Holmes, K., (1992). *Studies of a fatal pollutant-induced hyperbilirubinaemia in spawning Atlantic salmon*. Mar. Environ. Res. 34, 81-186.

Giari, L., Manera, M., Simoni, E., Deezfui, BS.(2007). *Cellular alterations in diferente organs of European sea bass Dicentrarchus labrax (L) exposed to cadmium*. Chemosphere.67,1171-1181.

Gilliers, C., Le Pape, O., Desaunay, Y., Morin, J., Gueérault, D. e Amara, R., (2006). *Growth and condition of juvenile sole (Solea solea L.) as indicators of habitat. Quality in coastal and estuarine nurseries in the Bay of Biscay with a focus on sites exposed to Erika oil spill*. Scientia Marina, 70: 183-192.

Gingerich, W.H. *Hepatic toxicology of fishes*. In: WEBER, L.F. (ed.) *Aquatic toxicology*, New York: Plenum Press. 1982. p. 55-105

Greenfield, B.K., Teh, S.J., Ross, J.R.M., Hunt, J., Zhang, G.H., Davis, J.A., Ichikawa, G., Crane, D., Hung, S.S.O., Deng, D.F., Teh, F.-C., Green, P.G. (2008). *Contaminant concentrations and histopathological effects in Sacramento splittail (Pogonichthys macrolepidotus)*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 55, 270–281.

Groman, D. B. (1982). *Histology of the striped bass*. Bethesda, 116p.

Hatch, A.C., Burton, Jr., G.A. (1999). *Sediment toxicity and storm water runoff in a contaminated receiving system: consideration of different bioassays in the laboratory and field*. Chemosphere 39, 1001-1017.

Heath S.M., Southworthe D., D'Allura J.A.(1997). *Localization of nickel in epidermal subsidiary cells of leaves of Thlaspi montanum var sikiyouuense (Brassicaceae) using energy-dispersive X-ray microanalysis*. Int J Plant Sci;158:184– 8.

Hinton, D. e Laurén, D., (1990). *Liver strutural alterations accompanying chronic Toxicity in fishes: Potencial biomarkers of exposure*. In: J. F. McCarthy and L. R. Shugart. Eds.: Biomarkers of Environmental Contamination. Florida: Lewis Publishers, pp. 17-57.

Hinton. D. E., Baumann, P. C., Gardner, G. C., Hawkins, W. E. Hendricks, J. D., Murchelano, R. A. e Okihiro, M. S., (1992). *Histopatologic biomarkers*. In: Huggett, R. J., Kimerly, R. A., Mehrle, P. M. e Bergman, H. L. (Eds), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Historical Markers of Antropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, pp. 155-210.

Howes, D. E., (1948). *Canadian Cataloguing in Publication Data British Columbia estuary mapping system*.

Huggett, R. J., Kimerle, A. R., Mehrle, P. M., Bergman, H. L. *Biomarkers biochemical, physiological, and histotological markers of anthropogenic stress*. SETAC.

Jiménez-Tenório, N., Morales-Caselles, C., Kalman, J., Salasnach, M.J., de Canales, M.L.G., Sarasquete, C., DelValls, T.A. (2007). *Determining sediment quality for regulatory purposes using fish chronic bioassays*. Environ Int 33:474-480

Jobling, M. (1995). *Environmental biology of fishes*. Vol. 16. Chapman and Hall, New York, pp. 455.

Kagi, J.H.R.; Shaffer, A (1988). *Biochemistry of metallothionein*. Biochemistry. 27:8509-8515

Kohler, A., (1990). *Identification of contaminant-induced cellular and subcellular lesions in the liver of flounder (Platichthys flesus L.) caught at differently polluted estuaries*. Aquat. Toxicol. 15, 271–294.

Klaassen, C. D.; Liu, J.; Choudhuri, S. (1999). *Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity*. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 19: 97-112.

Lee, B.G., Lee J.S., Luoma S. N., Choi H.J., Koh C.H. (2000). *Influence of acid-volatile sulfide and metal concentrations on metal bioavailability to marine invertebrates in contaminated sediments*. Environ Sci. Tech, 34: 4517-4523

Lillebo, A. I., Coelho, P.J., Pato, P., Válega, M., Margalho, R., Reis, M., Raposo, J., Pereira, E., Duarte, A. C., Pardal, M. A., (2010). *Assessment of Mercury in water, sediments and biota of a Southern european estuary (Sado estuary, Portugal)*. Water Air Soil Pollut 214: 667-680.

Livingstone. D. R., (1993). *Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular Biomarkers in the aquatic environment*. J. Chem. Tech. Biotech., 57: 195-211.

Lobo, J., Costa, P. M., Caeiro, S., Martins, M., Ferreira, A.M., Caetano, M., Cesário, R., Vale, C., Costa, M.H. (2010). *Evaluation of the potential of the common cockle (Cerastoderma edule L.) for the ecological risk assessment of estuarine sediments: bioaccumulation and biomarkers*. Ecotoxicology 19: 1469-1512.

Lobo, J. (2009). *Evaluatuion of the potential of translocated common cockle for ecological risk assessment studies: bioaccumulation and biomarkers test*. Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade de Lisboa, Lisboa.

Long, E.R. e Morgan, L.G. (1990). *The Potential for Biological Effects of Sediment-sorbed Contaminants Tested in the National Status and Trends Program*, Seattle, WA: National Oceanic and Atmospheric Administration.

Long, E.R. e MacDonald, D.D. (1992) *National Status and Trends Program Approach*. In Sediment classification methods compendium, pp. 14-1-18. Washington, DC: Office of Water, United States Environmental Protection Agency.

Long, ER., MacDonald, D. (1998). *Recommended uses of empirically derived, sediment quality guidelines for marine and estuarine ecosystems*. Hum Ecolo Risk Assess 4:1019-1039.

Loureiro, J. M., Nunes, M.N.F. e Botelho, O.F. (1984). *Monografia hidrológica do Rio Mira*. Évora, Direcção-Geral dos Recursos e Aproveitamentos Hidráulicos e Comissão de Coordenação da Região do Alentejo.

Luoma, S.N. (1990). *Processes affecting metal concentrations in estuarine and coastal marine sediments*, In *Heavy metals in the marine environment*, editado por FURNESS, R.W.; Rainbow, P., S.CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.51-66.

Lyons, B. P., Stentiford, G. D., Green, M., Bignell, J., Bateman, K., Feist, S. W., Goodsir, F., Reynolds, W. J., Thain, J. E., (2004). *DNA adduct analysis and histopathological biomarkers in European flounder (Platichthys flesus) sampled from UK estuaries*. Mutat. Res. 552, 177–186.

MacArthur, R. H., 1972. *Geographical Ecology: Patterns in the Distribution of Species*. Harper and Row, New York..

MacDonald, D.D., Smith, S.L., Wong, M.P. e Mudroch, P. (1992). *The Development of Canadian Marine Environmental Quality Guidelines*. Ottawa: Ecosystem Sciences and Evaluation Directorate, Conservation and Protection, Environment Canada.

Macdonald, D. D., Carr, R. S., Calder, F. D., Long, E. R., Ingersoll, C.G. (1996). *Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters*. Ecotoxicology 5: 253-278.

MacDonald, DD., Ingersoll, CG., Berger, TA. (2000). *Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems*. Arch Environ Contam Toxicol 39:20-21.

Macdonald, D. D., Carr, R. S., Eckenrod, D., Greening, H., Grabe, S., Ingersoll, C.G., Janicki, S., Janicki, T., Lndskoog, R. A., Long, E. R., Pribble, R., Sloane, G. (2004). *Development, Evaluation, and application of sediment quality targets for assessing and managing contaminated sediments in Tampa Bay, Florida*. Arch. Environ. Toxicol. 46: 147-161.

Majumder, S., Ghoshal, K., Summers, D., Bai, S., Datta, J., Jacob, ST. (2003). *Chromium (IV) down-regulates heavy-metal induced metallothionein gene transcription by modifying transactivation potential of the key transcription factor, metal-responsive transcription factor 1*. J Biol Chem 278:26216-26226

Malins, D. C., Krahn, M. M., Brown, D. W., Rhodes, L. D., Myers, M. S., McCain, B. B., & Chan, S.-L. (1985a). *Toxic chemicals in marine sediment and biota from Mukilteo, Washington: relationships with hepatic neoplasms and other hepatic lesions in English sole (Parophrys vetulus)*. Journal of the National Cancer Research Institute, 74, 487–494.

Martinez, C. B. R.; Cólus, I. M. S. (2002). Biomarcadores em peixes neotropicais para a monitorização da poluição aquática na bacia do rio Tibagi In: Medri, M.E.; Bianchini, E.; Shibatta, O.A.; Pimenta, J.A. (2002.) *A bacia do rio Tibagi*. Londrina: 2002. Cap. 29, p. 551 – 577.

Martoja, R., Martoja, M. (1967). *InitiationauxTechniques de l'Histologie Animal*. Masson & Cie, Paris.

McCarthy, J. F. e Shugart, L. R., (1990). *Biological Markers of environment Contamination*. In: McCarthy, J.F. e Shugart, L. R. (Eds), *Biomarkers of Environment Contamination*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 3-16.

Mela, M., Randi, M.A.F., Ventura, D.F., Carvalho, C.E.V., Pelletier, E., Oliveira, C.A. Ribeiro, (2007). *Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 68 (3): 426- 435.

Metcalf, C. D., Cairns, V. W., & Fitzsimons, J. D. (1988). *Experimental induction of liver tumours inrainbow trout (Salmogairdneri) by contaminated sediment from Hamilton harbour, Ontario*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 45, 2161–2167..

Miranda, A.L., Roche, H., Randi, M.A., Menezes, M.L., Ribeiro, C.A., (2008). *Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish Hoplias malabaricus: histopathological, physiological, and immunological findings*. *Environ. Int.* 34, 939–949.

Moore, M. J., Smolowitz, R. M., & Stegeman, J. J. (1997). *Stages of hydropic vacuolation in the liver of winter flounder Pleuronectes americanus from a chemically contaminated site*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 31, 19–28.

Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, MC, Abellán, E., Cardenete, G. (2004). *Oxidative stress and antioxidante defenses after prolonged starvation in Dentex dentex liver*. Comp. Biochem. Physiol. C 139,153-161.

Mouneyrac, C., Amiard, JC., Amiard-Triquet, C, Cottier, A., Rainbow, PS., Smith, BD (2002). *Partitioninf of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean Orchestia gammarellus: a cautionary tale on the use of metallothionein-like preoteins as biomarkers*, Aquat Toxicol 57:225-242

Myers, M., Johnson, L. , Hom, T., Collier, T., Stein, J, e Varanasi, U., (1998). *Toxicopathic hepatic lesions in subadult English Sole (Pleuronectesvetulus) From Puget Sound, Washington, USA. Relationship with other biomarkers of Contaminant exposure*. Mar. Environ. Res., 45: 47-67.

Myers, M. S., Rhodes, L. D., & McCain, B. B. (1987). *Pathologic anatomy and patterns of occurrence of hepatic neoplasms, putative preneoplastic lesions and other idiopathic hepatic conditions in English sole (Parophrys vetulus) from Puget Sound, Washington USA*. Journal of the National Cancer Institute, 78, 333–363

Mohid (2000). *Definição do limite de jusante dos estuários portugueses*. Maretec - Marine and Environmental Tecnology Center.

Moreira, S., Freitas, M.C., Araújo, M. F., Andrand, C., Munhã, J., Fatela, F., Cruces, A. (2009). *Contamination of intertidal sediments – the case of Sado estuary (Portugal)*.Journal of Coastal Research, Special Issue 56. 1380-1384.

Nipper, M. (2000). *Current approaches and future direction for contaminant-related impact assessment in coastal environments: Brazilian perspective*. *Aquat Ecosyst Health Manag* 3:433-447.

Nordberg M. (1998). *Metallothioneins: historical review and state of knowledge*. *Talanta* 46: 243–254.

Nowell, L.H., Capel, P.D., Dileanis, P.D. (1999). *Pesticides in Stream Sediments and Aquatic Biota – Distribution, Trends and Governing Factors*, CRC Press, Boca Raton Pesticides in the Hydrological System series.

NRC (1987): Committee on Biological Markers of the National Research Council. *Biological markers in environmental health research*. *Environ. Health Perspect.* 74 3.

Oliveira Ribeiro, C.A., Voltaire, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H., 2005. *Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (Anguilla anguilla) at the Camargue Nature Reserve, France*. *Aquat. Toxicol.* 74, 53–69.

Oliveira, R.E.S., Lima, M.M. e Vieira, J.M.P. (2007). *An indicator system for surface water quality in river basins*.

Olsson, P.E., Haux, C., (1986). *Increased hepatic metallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed perch (Perca fluviatilis)*. *Aquat. Toxicol.* 9, 231–242.

Palmiter, R. D., 1998. *Metallothionein facts and frustrations*. In: Klaassen, C. (Ed.), *Metallothionein IV*. BirkhauserVerlag, Basel, pp. 215–221.

Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S. e Vernet, G., (2000). *Biochemical and ultrastructural hepatic perturbations of Brachidanio Rerio (Teleostei Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of Copper Sulphate*. *Aqua Toxicol.*, 50: 109-124.

Persaud, D., Jaagumagi, R. and Hayton, A. (1992) *Guidelines for the Protection and Management of Aquatic Sediment Quality in Ontario*, Toronto, Ontario: Water Resources Branch, Ontario Ministry of the Environment.

Raimundo, J., Costa, P. M., Vale, C., Costa, M. H., Moura, I. (2010). *Metallothioneins and trace elements in digestive gland, gills, kidney and gonads of Octopus vulgaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 152: 139 -146.

Roberts, A.P., Oris, J.T., (2004). *Multiple biomarker response in rainbow trout during exposure to hexavalent chromium*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 138, 221–228.

Rodrigues, A. M. J., Quintino, V. M. S., (1993). *Horizontal biosedimentary gradients across the Sado estuary, W. Portugal*. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology* 27(2-4): 449-464.

Roesijadi, G., Robinson, W. E., (1994). *Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release*. In: Malins DC, Ostrander GK, editors. *Aquatic toxicology*. Boca Raton: Lewis Publishers; 1994. p. 387–420.

Romero-Isartek, N., Vasak, M., (2002). *Advances in the structure and chemistry of metallothioneins*. J. Inorg. Biochem. 88, 388–396.

Sá, R., Bexiga, C., Vieira, L., Veiga, P., Erzini, K. (2003). *Dies of the sle Solea vulgaris Quansel, 1806 and Solea senegalensis Kaup 1858 in the lower estuary of the Guadiana River (Algarve, Southern Portugal): preliminar results*. Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 19, 505-508.

Sanchez-Perez, Y., Carrasco-Legleu, C., Garcia-Cuellar, C., Perez-Carreón, J., Hernandez-Garcia, S., Salcido-Neyoy, M., Aleman-Lazarini, L., Villa-Trevino, S., (2005). *Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis*. Cancer Lett. 217, 25–32.

Schipper, C. A., Rietjens, I. M. C. M., Burgess, M.R., Murk, A.J. (2010). *Application of bioassays in toxicological hazard, risk and impact assessments of dredged sediments*. Marine Pollution Bulletin.

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W. e Triebkorn, R., (1997). *The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish*. J. Aquatic Ecosyst. Stress Recov., 6: 75-86.

Shariati, F., Sari, A. E., Mashinchian, A., Pourkazemi, M., (2010). *Metallothionein as portential biomarker of cadmium exposure in Persian Sturgeon (Acipenser persicus)*. Biol. Trace Elem. Res.

Shaw, B.J., Handy, R.D., (2006). *Dietary copper exposure and recovery in Nile Tilapia, Oreochromis niloticus*. Aquat. Toxicol. 76, 111–121.

Selye, H. (1956). *The Stress of Life*. McGrawHill, 1956, Nova Iorque.

Simes, D. C., Bebianno, M. J., Moura, J. J. G., (2003). *Isolation and characterization of metallothionein from the clam Ruditapes decussatus*. Aquat. Toxicol. 63, 307–318.

Simpson, M.G., Parry, M., Kleinkauf, D., Swarbreck, D., Walker, P., Leah, R.T., (2000). *Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (Platichthys flesus) from a UK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals*. Mar. Environ. Res. 50,

Simpson, M.G., (1992). *Histopathological changes in the liver of dab (Limanda limanda) from a contamination gradient in the North Sea*. Mar. Environ. Res. 34, 39–43

Spink, DC, Katz, BH, Hussain, MM, Spink, BC, Wu, S, Liu, N, Pause, R, Kaminsky, RP (2002). *Induction of CYP1A1 and CYP1B1 in T-47 human breast cancer cells by benzo[a]pyrene is diminished by arsenite*. Drug Metab Dispos 30:262-269.

Stentiford, G. D., Longshaw, M., Lyons, B. P., Jones, G., Green, M., Feist, S. W., (2003) *Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants*. Marine Environmental Research 55: 137-159.

Suzuki, J.S., Kodama, N., Molotov, A., Aoki, E., Tohyama, C., (1998). *Isolation and identification of metallothionein isoforms (MT-1 and MT-2) in the rat testis*. *Biochem. J.* 334, 695–701.

Takashima F, Hibiya T (1995). *An atlas of fish histology. Normal and pathological features*, 2nd ed. Tokyo: Kodansha.

Teh, S., Adams, S. M. e Hinton, D. E., (1997). *Histopathologic biomarkers in feral Freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress*. *Aquar. Toxicol.*, 37: 51-70.

Teixeira, P., (2008). *Avaliação da histopatologia hepática em boga (Chondrostomapolylepis) e barbo (Barbusbocagei) capturados no Rio Vizela*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto do Douro.

Triebkorn, R., Telcean, I., Casper, H., Farkas, A., Sandu, C., Stan, G., Colărescu, O., Dori, T., Kohler, H.-R., (2008). *Monitoring pollution in River Mures, Romania, part II: Metal accumulation and histopathology in fish*. *Environ. Monit. Assess.* 141, 177–188.

Tucker Jr., J.W., Lellis, W.A., Vermeer, G.K., Roberts Jr., D.E., Woodward, P.N., (1997). *The effects of experimental starter diets with different levels of soybean or menhaden oil on red drum (Sciaenops ocellatus)*. *Aquaculture* 149, 323–339.

Vakharia, D.D., Liu, N., Pause, R., Fasco, M., Bessette, E., Zhang, Q.-Y., Kaminsky, L.S., (2001). *Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures: effect on PAH induction of CYP1A1 in human HEPG2 cells*. Drug Metab. Dispos. 29, 999–1006.

Van der Oost, R., Beyer, J. e Vermeulen, N., (2003). *Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental risk Assessement: A Review*. Environ. Toxicol.Pharmac., 13: 57-149.

Van Gestel, C. A. M., Van Brummelen, T. C., (1996). *Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms*. Ecotoxicology 5.

Vasconcelos, R. P., Reis-Santos, P., Fonseca, V., Ruano, M., Tanner, S., Costa, M.J., Cabral, H.N., (2009). *Juvenile fish condition in estuarine nurseries along the Portuguese coast*. Estuarine Coastaland Shelf Science 82: 128-138.

Vendemiale, G., Graattagiiano, I., Caraceni, P., Caraccio, G., Domenicali, M., Dall'Agata, M., Trevisani, F., Guerrieri, F., Bernardi, M., Altomare, E. (2001). *Mitochondrial oxidative injury and energy metaboism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status*. Hepatology 33, 808-815.

Vergani, L., Grattarolaa, M., Grasselli, E., Dondero, F., Viarengo, A., (2007). *Molecular characterization and function analysis of MT-10 and MT-20 metallothionein isoforms from Mytilusgallo provincialis*. Arch. Biochem. Biophys. 465, 247–253.

Vethaak, A. D., Wester, P. W., 1996. *Diseases of flounder *Platichthys flesus* in Dutch coastal and estuarine waters, with particular reference to environmental stress factors. II. Liver histopathology*. Dis. Aquat. Org. 26, 99–116..

Viarengo, A. (1989). *Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level*. CRC Reviews in Aquatic Science. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 295–317.

Viarengo, A., Nott, J. A., (1993). *Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates*. Comp. Biochem. Physiol. C 104 (3), 355–372.

Viarengo, A.; Burlando, B.; Cavaletto, M.; Marchi, B.; Ponzano, E. e Blasco, J. (1999). *Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis**. Am.J.Physiol-Reg. I, 277: R1612-R1619.

Viarengo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., (2000). *Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview*. Cell. Mol. Biol. 46, 407 - 417.

Vlachogianni, T., Valavanidis, A., (2007a). *Integrated Biomarkers in Aquatic Organisms as a Tool for Biomonitoring Environmental Pollution and Improved Ecological Risk Assessment*. Science advances on environment, toxicology & ecotoxicology issues.

Vlachogianni T, Dassenakis M, Scoullos MJ, Valavanidis A. (2007b) *Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece*. Mar Pollut Bull 54:1361-1371

Wan, M., Hunziker, P.E., Kagi, J.H.R., (1993). *Induction of metallothionein synthesis by cadmium and zinc in cultured rabbit kidney cells (RK-13)*. Biochem. J. 292, 609–615.

WHO (1993) International Programme on Chemical Safety (IPCS), Biomarkers and risk assessment: concepts and principles, Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

ANEXO 1

Dados Morfométricos - Comprimento standard:Tabela 12 - Comprimento standard dos indivíduos *S.senegalensis* amostrados no estuário do Sado.

Sado	
Indivíduo	Cs (mm)
SSS01	190
SSS02	201
SSS03	164
SSS04	181
SSS05	196
SSS06	169
SSS07	182
SSS08	179
SSS09	185
SSS10	166
SSS11	226
SSS12	173
SSS13	192
SSS14	172
SSS15	182
SSS16	198
SSS17	176
SSS18	180
SSS19	184
SSS20	194
SSS21	180

Tabela 13 - Comprimento standard dos indivíduos *S.senegalensis* amostrados no estuário do Sado.

Mira	
Indivíduo	Cs (mm)
SSM01	300
SSM02	326
SSM03	185
SSM04	122

Análise biológica – Quantificação de MTsTabela 14 - Concentração de MT do fígado dos indivíduos *S.senegalensis* amostrados na estação do Sado.

Sado	
Indivíduo	Concentração de MT (mg.g⁻¹ peso seco)
SSS01	2,61
SSS02	3,72
SSS03	1,39
SSS04	1,57
SSS05	2,12
SSS06	1,25
SSS07	2,98
SSS08	0,49
SSS09	2,57
SSS10	0,90
SSS11	3,63
SSS12	5,03
SSS13	3,86
SSS14	3,33
SSS15	5,34
SSS16	2,65
SSS17	5,50
SSS18	4,86
SSS19	2,90
SSS20	3,02
SSS21	2,08

Tabela 15 - Concentração de MT do fígado dos indivíduos *S.senegalensis* amostrados na estação do Mira.

Mira	
Indivíduo	Concentração de MT (mg/g peso seco)
SSM01	1,507418915
SSM02	4,714528121
SSM03	3,221462951
SSM04	0,731976431

Tabela 16 - Concentrações de metais pesados presentes no estuário do Sado e valores de SQGQ associados (Caeiro,2005).

Número de amostras	SQGQ	Cádmio ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Chumbo ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Zinco ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Cobre ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Arsénio ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Crómio ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
1	0.66	5,8	64	206	59	22	33
2	0.33	2,8	24	98	30	15	20
4	0.15	1,3	28	34	7	7,2	5
8	0.07	0,9	2	4	4	3	2
10	0.05	0,3	3,5	7,4	1	4,5	0,6
11	0.04	0,2	3,6	6,4	1	3,6	0,6
14	0.38	3,5	17	110	31	21	26
16	0.12	1,1	6,2	32	10	7,5	6
17	0.47	3,2	26	149	46	21	26
19	0.44	3,9	21	130	48	21	26
21	0.12	1	5,1	34	9	7,6	8
23	0.15	1	3,5	24	5	21	4
24	0.09	1,1	2	9	4	8	2
25	0.12	0,4	3,4	2,1	10	21	1
26	0.06	0,3	3,6	3,3	1	7,9	1
31	0.04	0,5	3,3	6,3	2	1,1	2
32	0.05	0,5	3,1	7,9	3	3,1	2
33	0,17	0,2	8,9	56	21	12	12
34	1,03	8	36	272	149	54	63
35	0,73	6	28	213	98	33	38
36	0,23	2	8,9	67	24	13	14
37	0,23	1,6	9,4	56	15	9,4	9
39	0,33	2,5	16	104	42	16	19
40	0,85	6,5	35	273	92	41	52
43	1,08	6,4	69	507	191	37	44
52	0,14	1,2	5	57	6	10	5
53	0,21	2,1	8,3	79	15	12	15
55	0,12	1,3	5	49	5	7	2
56	0,18	1,5	8,4	52	13	9,1	10
57	0,22	2,2	13	69	15	11	13
58	0,25	2,3	11	74	22	12	16
59	0,1	1,3	5,3	20	7	4	4
60	0,06	0,6	3,3	12	4	3,3	2
61	0,21	1,8	10	56	16	11	11
63	0,06	0,4	3,7	19	3	3,7	2
65	0,14	1,2	7	42	14	9	10
68	0,53	3,7	23	131	34	26	28
70	0,15	1,4	8	47	11	9	8
74	0,07	0,6	3	12	3	7	2
75	0,08	0,8	4	28	4	3	2
76	0,14	1,5	8	51	6	8	5

Número de amostras	SQGQ	Cádmio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Chumbo ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Zinco ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Cobre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Arsénio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Crómio ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
80	0.18	1.60	8.00	82.00	16.00	8.00	8.00
82	0.12	1.00	4.00	34.00	6.00	9.00	5.00
85	0.07	0.40	3.50	29.00	2.00	6.40	1.00
86	0.14	0.70	19.00	85.00	3.00	8.00	4.00
90	0.46	3.30	23.00	131.00	31.00	23.00	26.00
93	0.27	0.80	5.00	28.00	6.00	58.00	5.00
95	0.09	0.60	4.00	57.00	11.00	2.00	2.00
98	0.14	1.20	6.00	58.00	9.00	9.00	9.00
102	0.60	6.30	2.00	199.00	43.00	38.00	45.00
104	0.18	1.60	8.00	65.00	12.00	12.00	11.00
105	0.17	1.50	7.00	65.00	11.00	10.00	11.00
108	0.12	1.10	6.00	40.00	8.00	7.00	7.00
111	0.09	0.70	4.00	16.00	4.00	8.00	4.00
113	0.14	1.40	7.00	41.00	9.00	7.00	8.00
116	0.07	0.60	3.00	13.00	3.00	7.00	2.00
117	0.10	0.80	4.00	18.00	4.00	9.00	2.00
118	0.08	0.60	3.00	19.00	3.00	7.00	3.00
119	0.15	1.40	7.00	47.00	8.00	9.00	8.00
125	0.54	5.60	22.00	162.00	39.00	29.00	37.00
128	0.16	1.00	5.00	37.00	10.00	7.00	8.00
131	0.19	1.80	9.00	58.00	14.00	11.00	14.00
132	0.06	0.70	2.00	4.00	4.00	3.00	2.00
136	0.20	1.80	10.00	70.00	12.00	14.00	12.00
138	0.06	0.60	2.00	17.00	3.00	2.00	2.00
139	0.79	5.90	48.00	295.00	94.00	39.00	48.00
147	0.08	0.80	3.00	22.00	4.00	6.00	4.00
148	0.08	0.60	2.00	20.00	3.00	7.00	2.00
149	0.08	0.60	3.00	15.00	3.00	7.00	3.00
150	0.78	7.40	33.00	219.00	70.00	45.00	54.00
151	0.08	0.80	3.00	14.00	3.00	6.00	3.00
153	0.25	3.00	10.00	86.00	20.00	14.00	18.00
156	0.19	1.70	7.00	74.00	12.00	13.00	13.00
157	0.67	6.20	24.00	221.00	49.00	41.00	52.00
800	0.07	0.60	2.00	5.00	3.00	7.00	2.00
1110	0.07	0.60	3.00	12.00	3.00	7.00	2.00
1111	0.16	1.70	6.00	40.00	10.00	9.00	9.00
1240	0.12	1.30	5.00	32.00	6.00	8.00	6.00
Máximo	1,08	8	69	507	191	54	63
Mínimo	0,06	0,2	2	2,1	1	1,1	0,6